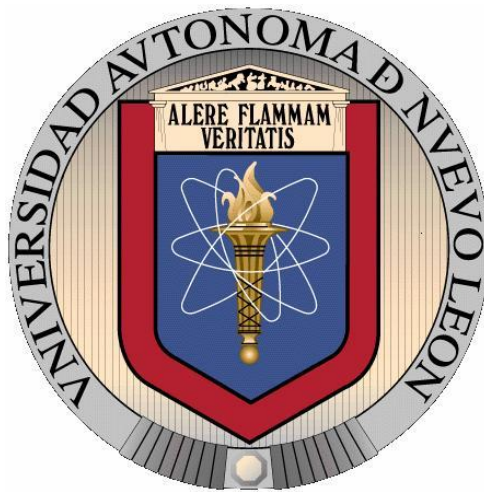


# **Universidad Autónoma de Nuevo León**

## **Facultad de Medicina**



### **Evaluación del efecto neuroprotector de la glibenclamida en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson**

Por:

**M.C.P Erick García Hernández**

Como requisito parcial para obtener el título de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Morfología

Septiembre 2018

**Evaluación del efecto neuroprotector de la glibenclamida en un modelo  
murino de la enfermedad de Parkinson**

Aprobación de la Tesis:



---

**Dr. en C. Arnulfo Villanueva Olivo**  
Director de Tesis




---

**Dra. en C. Laura Mireya Zavala Flores**  
Co-director de Tesis



---

**Dr. en C. Adolfo Soto Domínguez**  
Miembro de la Comisión



---


**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirección de Estudios de Posgrado

# Evaluación del efecto neuroprotector de la glibenclamida en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson

Presentado por:


M.C.P Erick García Hernández

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Arnulfo Villanueva Olivo; en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS), con la asesoría de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la Dra. Laura Mireya Zavala Flores; y en el Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana con la asesoría del Dr. Daniel Hernández Baltazar.




---

**Dr. en C. Arnulfo Villanueva Olivo**  
Departamento Histología  
Facultad de Medicina-UANL




---

**Dra. en C. Odila Saucedo Cárdenas**  
CIBIN-IMSS



---

**Dra. en C. Laura M. Zavala Flores**  
CIBIN-IMSS



---

**Dr. en C. Daniel Hernández Baltazar**  
Instituto de Neuroetología-UV

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme la oportunidad de estudiar la Maestría en Ciencias y cumplir mi meta.

Agradezco a mis directores de tesis, la Dra. Laura Zavala y el Dr. Arnulfo Villanueva, por confiar en mí para sacar adelante este proyecto. Por dedicarme su tiempo y permitirme aprender de ellos. Por sentarse conmigo a enseñarme y siempre estar disponibles para ayudarme. Por su paciencia y entrega en cada momento.

Al Dr. Daniel Hernández que me recibió con los brazos abiertos en Xalapa, y que invirtió su tiempo y esfuerzo para que yo creciera como persona y como científico. Por abrirme el camino a nuevos conocimientos, retos y metas. Por siempre estar al pendiente de mi bienestar y mi alimentación. Por sus grandes consejos: profesionales y de la vida.

A la Dra. Odila Saucedo y al Dr. Adolfo Soto por sus retroalimentaciones, que me ayudaron a mejorar y perfeccionar, tanto en lo personal, como en lo profesional. Por sus consejos y observaciones que permitieron que este proyecto pudiera crecer.

Agradezco la estancia en Xalapa, ya que conocí a personas apasionadas por la ciencia, dedicadas y comprometidas. También me permitió hacer nuevos amigos: Abril Barrientos, amiga y compañera de desvelos, por apoyarme desde el primer día, sin pedir nada a cambio, por siempre estar dispuesta a ayudarme y por brindarme su conocimiento. Abraham Puga, por sus consejos y apoyo en áreas que se me dificultaban y por hacer mi estancia más cómoda y divertida.

Y, por último, a mis compañeros y amigos de la maestría, que me brindaron consejos y apoyo en todo momento. Por permitir que estos dos años fueran divertidos, de muchos conocimientos y muchas experiencias. Que me permitieron poder conocer nuevas formas de pensar, de ver el mundo y la ciencia.

## Contenido

Lista de figuras.....	vi
Lista de tablas .....	vii
Lista de abreviaturas .....	viii
Resumen.....	1
1. Introducción .....	2
2. Antecedentes .....	3
2.1 Enfermedad de Parkinson .....	3
2.2 Neuroinflamación .....	4
2.3 Susceptibilidad de la SNpc .....	6
2.4 Barrera hematoencefálica .....	6
2.5 Glibenclamida.....	7
2.6 Receptor de sulfonilurea .....	8
2.7 Modelos murinos de EP .....	9
2.7.1 Lipopolisacárido .....	9
2.7.2 6-hidroxidopamina .....	10
3. Justificación .....	11
4. Hipótesis .....	12
5. Objetivos.....	12
6. Métodos .....	13
6.1 Clasificación del estudio.....	13
6.2 Animales de experimentación.....	13
6.3 Condiciones de alojamiento de los animales de experimentación.....	13
6.4 Criterios .....	14
6.4.1 Criterios de inclusión.....	14

6.4.2 Criterios de exclusión .....	14
6.4.3 Criterios de eliminación .....	14
6.5 Grupos experimentales .....	14
6.6 Estrategia experimental.....	17
6.7 Cirugía estereotáxica.....	18
6.8 Pruebas conductuales .....	19
6.9 Determinaciones bioquímicas.....	20
6.9.1 Glucemia .....	20
6.10 Obtención de las muestras .....	20
6.11 Determinaciones séricas .....	21
6.11.1 Perfil de funcionamiento hepático.....	21
6.12 Preparación de tejido para inmunotinciones .....	21
6.13 Inmunofluorescencia indirecta para TH, SUR1, GFAP y CD11b/c .....	21
6.14 Inmunohistoquímica con diaminobencidina (DAB).....	23
6.15 Análisis densitométrico.....	23
6.16 Análisis estadístico .....	24
7. Resultados.....	25
7.1 Determinación de peso, glucemia y temperatura.....	25
7.2 Pruebas conductuales.....	26
7.3 Pruebas de función hepática .....	30
7.4 Análisis morfológico.....	32
8. Discusión .....	38
9. Conclusión .....	41
10. Referencias.....	42

## Lista de figuras

Figura 1. Esquema de los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ).....	8
Figura 2. Esquema de los grupos experimentales .....	15
Figura 3. Estrategia experimental .....	17
Figura 4. Registro de peso, nivel de glucosa y temperatura corporal .....	25
Figura 5. Prueba de campo abierto (Variable: Cuadros cruzados) .....	26
Figura 6. Prueba de campo abierto (Variable: Conducta vertical) .....	27
Figura 7. Prueba de campo abierto (Variable: Tiempo total de acicalamiento) .....	28
Figura 8. Prueba de coordinación motora .....	29
Figura 9. Determinaciones séricas del grupo lesionado con LPS .....	30
Figura 10. Determinaciones séricas del grupo lesionado con 6-OHDA .....	31
Figura 11. Lesión inducida por LPS y 6-OHDA en el mesencéfalo de rata .....	32
Figura 12. Efecto de la glibenclamida en la lesión inducida por LPS y 6-OHDA .....	33
Figura 13. Efecto de la glibenclamida en la expresión de SUR1 .....	34
Figura 14. Efecto de la glibenclamida en la expresión de GFAP .....	35
Figura 15. Efecto de la glibenclamida en la neuroinflamación .....	36

## **Lista de tablas**

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios .....	22
--	----



## Lista de abreviaturas

6-OHDA: 6-hidroxidopamina  
ABC: complejo avidina-biotina-peroxidasa  
ALT: alanina aminotransferasa  
ARN: ácido ribonucleico  
AST: aspartato aminotransferasa  
ATP: adenosina trifosfato  
AVT: Área Ventral Tegmental  
BHE: barrera hematoencefálica  
CD14: cluster de diferenciación 14  
DA: dopamina  
DAB: diaminobencidina  
DAT: transportador de dopamina  
DM2: diabetes mellitus tipo II  
DMSO: dimetilsulfóxido  
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
EP: enfermedad de Parkinson  
Gb: glibenclamida  
GFAP: proteína ácida fibrilar glial  
GLDH: glutamato deshidrogenasa  
IgG: inmunoglobulina G  
IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta  
IL-6: interleucina 6  
K<sub>ATP</sub>: canales de potasio sensibles a ATP  
KCl: cloruro de potasio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato monopotásico  
LPS: lipopolisacárido  
MAO: monoaminoxidasa  
MD2: factor de diferenciación mieloide 2  
MPTP: 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: fosfato dibásico de sodio

NaCl: cloruro de sodio  
NDM: neuronas dopaminérgicas mesencefálicas  
NM: neuromelanina  
NO: óxido nítrico  
NOM: Norma Oficial Mexicana  
PBS: buffer fosfato salino  
PFA: paraformaldehído  
PFH: pruebas de función hepática  
PQ: paraquat  
ROS: especies reactivas de oxígeno  
SNC: sistema nervioso central  
SNpc: sustancia nigra pars compacta  
SUR: receptor de sulfonilurea  
T°amb: temperatura ambiente  
TH: tirosina hidroxilasa  
TLR4: receptor tipo Toll 4  
TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa  
Trpm4: potencial transitorio del receptor melastatina 4  
UPEAL: Unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio  
VMAT2: transportador vesicular monoamino

## Resumen

**Erick García Hernández**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Medicina**

**Fecha de Graduación: Septiembre de 2018**

**Título del estudio:** Evaluación del efecto neuroprotector de la glibenclamida en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson

**Número de páginas: 58**

**Candidato para el grado de Maestro en Ciencias  
con Orientación en Morfología**

**Área de estudio: Morfología**

**Propósito y Método de estudio:** La enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes. Se caracteriza por presentar pérdida de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (NDM) y la presencia de inclusiones proteínicas citoplasmáticas, denominados cuerpos de Lewy. La pérdida de las NDM causa una disminución del contenido de dopamina en el cuerpo estriado que genera síntomas como tremor en reposo, rigidez, bradicinesia e inestabilidad postural. Además, en la EP ya se ha demostrado la presencia de neuroinflamación, debido a la presencia de citosinas proinflamatorias, las cuales pueden causar un aumento de permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), por lo que este proceso juega un papel importante en la neurodegeneración. Ha sido demostrado que la glibenclamida; que es una sulfonilurea usada para el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2, al ser administrada en isquemia y hemorragia cerebral, donde hay una interrupción de la BHE, ayuda a disminuir la permeabilidad de la barrera, inhibe la caspasa 3 activa, reduce la gliosis, el edema, el tamaño del infarto cerebral y mejora la función neurológica. Inclusive se ha reportado que pacientes diabéticos en tratamiento con glibenclamida tienen mejor pronóstico al sufrir un infarto cerebral que los pacientes que no están bajo este tratamiento. Por lo antes descrito, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto neuroprotector de la glibenclamida en el modelo murino con lipopolisacárido (LPS) y en el modelo murino con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) de la EP. Se realizó el modelo de EP en ratas lesionadas con LPS y con 6-OHDA, se trataron con glibenclamida cada 24 horas durante 5 y 7 días, respectivamente. Se evaluó el comportamiento motor de las ratas lesionadas y de los controles mediante pruebas conductuales, como campo abierto y rotarod. Por medio de análisis morfológico empleando inmunofluorescencia, se evaluó la población dopaminérgica al detectar la tirosina hidroxilasa (TH), una proteína específica de NDM; y la neuroinflamación por medio de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), específica de astrocitos, así como el receptor CD11b/c clona OX-42, específica para microglía. Así mismo se evaluaron los niveles de expresión del receptor de glibenclamida (SUR1).

**Contribuciones y conclusiones:** En este trabajo se establecieron dos modelos con las toxinas, LPS y 6-OHDA para estudiar neuroinflamación. Dichos modelos se analizaron a los días 3 y 5 respectivamente. La aplicación de las pruebas conductuales nos permitió concluir que las toxinas no inducen alteraciones motoras a los tiempos analizados. Se observó que en el grupo tratado con LPS y glibenclamida, el fármaco protegió a las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la muerte causada por LPS. Las toxinas no tuvieron efecto sobre la función hepática, lo que nos indica la especificidad que tienen éstas hacia las NDM. La glibenclamida previno la activación de la microglía a un estado fagocítico en el modelo de LPS.

---

**Dr. en C. Arnulfo Villanueva Olivo**  
Director de Tesis

## **1. Introducción**

La enfermedad de Parkinson (EP) es considerada por la Organización Mundial de la Salud como la segunda enfermedad neurodegenerativa más común. En México, ocupa el tercer lugar en frecuencia dentro de las enfermedades neurológicas atendidas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Esta patología se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas ubicadas en la sustancia nigra que controlan el movimiento motor voluntario. Estas neuronas tienen prolongaciones que inervan el cuerpo estriado y donde ocurre la liberación de la dopamina, uno de los principales neurotransmisores que participan en numerosas funciones como coordinación motora, emociones, memoria, mecanismos de recompensa, entre otras. La pérdida de las neuronas dopaminérgicas causa una disminución en el contenido de dopamina, lo que ocasiona los síntomas característicos de la enfermedad. Existen varios mecanismos celulares que se activan antes de que ocurra la muerte neuronal. Uno de los principales mecanismos que juega un papel relevante en la progresión de la muerte de las neuronas dopaminérgicas, es la neuroinflamación.

La neuroinflamación consiste en la activación de las células gliales residentes en el cerebro, que liberan mediadores proinflamatorios. Este proceso induce cambios en la integridad de la barrera hematoencefálica, permitiendo el paso no-selectivo de diversas moléculas. El aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, observada en la EP, se ha considerado una característica importante que nos permita la administración de medicamentos que puedan ayudar a disminuir la neuroinflamación. Uno de los medicamentos que ha demostrado tener un efecto protector al disminuir la neuroinflamación, es la glibenclamida.

La glibenclamida es una sulfonilurea utilizada ampliamente para el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2. El uso de este medicamento ha resultado efectivo para disminuir la neuroinflamación y la progresión de la muerte neuronal en la EP.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes, siendo la segunda causa de este grupo de enfermedades después de la enfermedad del Alzheimer. En México, se presenta predominantemente en población masculina (56%), similar a lo reportado en estudios internacionales y con una edad media de 64.7 años  $\pm$  12.9 años (1). Presenta una prevalencia entre 40 a 50 casos por cada 100,000 personas por año y se ha convertido en la cuarta causa de consulta en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (2).

El 90% de los casos de la EP no tiene una causa definida (EP idiopática), por lo que se considera una enfermedad multifactorial. Los casos restantes, son debidos a componentes hereditarios (3). Se caracteriza por presentar pérdida de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (NDM) ubicadas en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y la presencia de inclusiones proteínicas citoplasmáticas, denominados cuerpos de Lewy. La pérdida de las NDM causa una disminución del contenido de dopamina (DA) en el cuerpo estriado que genera síntomas característicos de la enfermedad como: bradicinesia, el cual se define como lentitud de movimientos; temblor en reposo, unilateral y distal; rigidez, que se caracteriza por el aumento en resistencia en el rango de movimiento pasivo de extremidades; y la inestabilidad postural, que se debe a la pérdida de reflejos posturales que se manifiesta en etapas tardías de la enfermedad (4).

En la actualidad, el tratamiento de la EP se basa en el control de la sintomatología siendo la levodopa el fármaco más utilizado, pero se ha encontrado que está asociado a complicaciones motoras como fluctuaciones y discinesias en el uso crónico (5). Sin embargo, no existen tratamientos que detengan o disminuyan la progresión de la enfermedad.

Se ha logrado conocer y describir o distintos mecanismos involucrados en la patogénesis de la EP idiopática que ayudan a comprender como ocurre el deterioro progresivo de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra. Estos mecanismos son los siguientes: mal plegamiento y agregados de la proteína alfa-sinucleína, disfunción del sistema ubiquitina-proteosoma, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, alteración del sistema autofagia-lisosomal y neuroinflamación (6).

## 2.2 Neuroinflamación

La neuroinflamación consiste en la activación de los componentes de la glía los cuales se puede dividir en astrocitos, microglía y oligodendrocitos. Los astrocitos son un tipo celular importante ya que tiene como función el soporte neuronal, nutrición, la eliminación de compuestos tóxicos y la producción de sustancias neurotróficas (7). Su función en la degeneración se debe a una activación sostenida y persistente, ya que en este estado activado expresa importantes moléculas inflamatorias que conllevan a la activación de la microglía (8).

La microglía constituye alrededor del 10% de la población de la glía, y tienen el papel del sistema inmune innato del sistema nervioso central (SNC) (9). Tiene una morfología ramificada en su estado en reposo pero ciertos estímulos (muerte neuronal, daño mecánico, toxinas) pueden modificar su morfología a un estado activado, siendo ameboides con somas de mayor tamaño, procesos cortos y gruesos y pueden llegar a transformarse en fagocitos con las señales apropiadas (8). Otra población celular de la glía son los oligodendrocitos, cuyo principal papel es la producción de mielina. Sin embargo, estos no parecen tener un papel en la neuroinflamación aunque se ha reportado que producen factores neurotróficos que pudieran estar involucrados en la EP (7).

La glía normalmente tiene la función de proteger al SNC, pero al ser activada, puede contribuir al daño en la neuroinflamación. Esta respuesta es denominada gliosis reactiva y es una característica neuropatológica de la enfermedad, ya que está asociada con la degeneración de las NDM (10). En cerebros intactos, la microglía se encarga de la respuesta inmune y se activa cuando se presenta alguna respuesta de inflamación, lesión o isquemia. Al haber una lesión, se activa la microglía. Las neuronas dañadas liberan ATP que activa a los receptores P2Y (relacionados en la polarización y movilidad de la microglía) y provoca la migración de la microglía hacia el sitio para fagocitar a la neurona dopaminérgica mesencefálica dañada (11).

La asociación de la activación de la microglía y el proceso patológico en EP se demostró por Gerhard y cols., donde observaron un incremento en la expresión del receptor periférico de la benzodiazepina, específico para microglía activada, en pacientes con EP (12). Esto nos demuestra que, al haber un aumento de la microglía activa, se modifican los niveles de expresión de proteínas

importantes para el correcto funcionamiento de las NDM. Actualmente, se sabe que la neuroinflamación puede permanecer activa y convertirse en un proceso crónico, provocando disfunción y muerte neuronal (13).

Otro de los tipos celulares importantes en la EP son los astrocitos que mantienen las funciones neuronales por medio de los siguientes mecanismos (14): protección por medio de antioxidantes, eliminación del glutamato, formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BHE), la liberación de citocinas y gliotransmisores.

Los astrocitos expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un filamento intermedio que tiene un papel importante en el metabolismo del cerebro. Los astrocitos ejercen un papel en la neurodegeneración, cuando liberan citocinas proinflamatorias que provocan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y peroxidación de lípidos, así como la activación de mecanismos apoptóticos en las neuronas vecinas. Durante la patología de la EP, hay un cambio en la morfología de los astrocitos, un aumento de la expresión de GFAP, que puede llevar al aumento de la permeabilidad de la BHE (15).

En la gliosis reactiva, la microglía induce la liberación de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas favorecen la permeabilización de la BHE y pueden ser relevantes en el desarrollo, plasticidad y reparación del SNC (16, 17). Se han descrito niveles elevados de citocinas proinflamatorias en cerebros de pacientes con EP (18). Las citocinas elevadas mayormente descritas son el factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ), interleucina-1 beta ( $\text{IL-1}\beta$ ) y la interleucina-6 ( $\text{IL-6}$ ) (19, 20). Estas citocinas se han encontrado en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo. Se ha determinado que hombres con un incremento en los niveles plasmáticos de la  $\text{IL-6}$  tienen un mayor riesgo de desarrollar EP (21). El  $\text{TNF}\alpha$  se ha encontrado aumentada en pacientes con EP al igual que en los modelos murinos inducidos con 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina (MPTP) y 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (22).

Además, se ha comprobado que la baja expresión crónica de  $\text{TNF}\alpha$  tiene un efecto neuroprotector en las NDM (23). La  $\text{IL-1}\beta$  es una citocina producida por los macrófagos activados

y se encuentra elevada en modelos de neuroinflamación. Se ha observado que la administración de antagonistas del receptor de IL-1 sistémico, disminuye la degeneración neuronal (21).

### **2.3 Susceptibilidad de la SNpc**

Existen distintos factores que provocan que la SNpc sea una zona muy susceptible a la neuroinflamación. Se ha sugerido que la propia DA puede ser fuente de estrés oxidativo ya que es sintetizada a partir de la tirosina por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y la enzima aminoácido aromático descarboxilasa. La DA se almacena en vesículas sinápticas posterior a su captación por medio del transportador vesicular monoamino 2 (VMAT2). Pero cuando existe una cantidad excesiva de DA en citosol, esta se metaboliza vía monoaminoxidasa (MAO) o por autooxidación a ROS. Estos procesos oxidativos alteran la respiración mitocondrial al igual que cambian la permeabilidad de los poros en las mitocondrias cerebrales (24, 25).

En la SNpc se ha observado una alta proporción de microglía comparado con otras regiones del cerebro (26). Barcia y cols. demostraron en un modelo parkinsoniano en monos, la presencia de microglía activa con características fagocíticas después de varios años de recibir la neurotoxina MPTP (27). Una característica de la SNpc es la presencia de neuromelanina (NM), un producto de la oxidación de DA. Se cree que la NM es una de las responsables de inducir neuroinflamación en la EP, ya que su liberación activa a la microglía promoviendo la degeneración de neuronas vecinas (28).

### **2.4 Barrera hematoencefálica**

La BHE está conformada por vasos sanguíneos continuos, no fenestrados que regulan el paso de moléculas, iones y células entre el torrente sanguíneo y el SNC (29). Una de las estrategias que ha sido utilizada frecuentemente para el tratamiento de muchas enfermedades, es el envío de moléculas terapéuticas que puedan atravesar la BHE. Se ha demostrado que en la EP existe una interrupción de dicha barrera y aumenta su permeabilidad (17, 30). Esta característica adversa es aprovechada para enviar medicamentos que puedan tener un efecto neuroprotector. La glibenclamida es uno de los medicamentos que ha mostrado un efecto protector en varios padecimientos del SNC donde está involucrada la neuroinflamación.



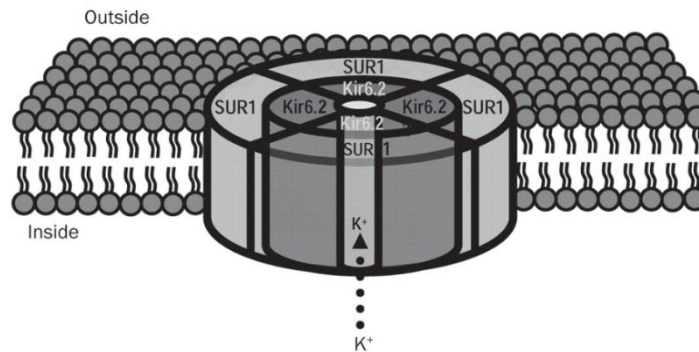
## 2.5 Glibenclamida

Es una sulfonilurea de segunda generación utilizada en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo II (DM2). En el páncreas, actúa inhibiendo los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) en las células beta, específicamente en la subunidad del receptor de sulfonilurea (SUR). Esto induce un cierre de este canal, lo que genera despolarización de la membrana, internalización del calcio y la exocitosis de las vesículas de insulina (31).

En un estudio realizado por Ortega y cols. se demostró que la glibenclamida se une a las células de la microglía reactiva que expresan SUR1. Para demostrar esto, utilizaron una forma de glibenclamida marcada con fluorescencia y observaron su distribución en un cultivo primario de microglía en reposo y activado por LPS. Se observó que, en la microglía en reposo, la glibenclamida se localizaba en el espacio perinuclear; mientras que en la microglía activada por LPS, la glibenclamida había sido movilizada a la membrana plasmática, denotando una translocación de SUR1 desde su reservorio interno hacia la superficie celular (32).

En modelos de hemorragia subaracnoidea, la glibenclamida redujo la liberación de  $TNF\alpha$  inhibiendo los canales Sur1-Trpm4, un canal iónico no selectivo el cual juega un papel en el edema citotóxico, formación de edema vasogénico y alteración de la BHE (33). Al aumentar la expresión de Sur1-Trpm4, se observó el aumento de la permeabilidad de la BHE relacionada con la expresión de  $TNF\alpha$ . El tratamiento con la glibenclamida redujo la extravasación de proteínas del suero al bloquear estos canales (34).

Los canales  $K_{ATP}$  funcionan como sensores del estado metabólico de la célula y lo acoplan con el potencial de membrana por medio de la detección de los niveles de ATP intracelular. Los canales  $K_{ATP}$  están conformados por un complejo octamérico de 4 subunidades de Kir6 y 4 subunidades SUR (35) (Figura 1). La subunidad Kir6 regula el transporte de potasio mientras que SUR tiene un papel regulador al modular la actividad del canal por medio del ATP intracelular. A pesar de que los canales  $K_{ATP}$  han sido principalmente estudiados en páncreas, estos también se encuentran en neuronas, como en la corteza, sustancia nigra, núcleo caudado e hipocampo, donde también son inhibidos por las sulfonilureas (36).



**Figura 1. Esquema de los canales de  $K_{ATP}$ .** Compuesto por 4 subunidades estructurales de Kir6.2 formadores del canal y 4 subunidades de SUR1 que tiene función reguladora.

## 2.6 Receptor de sulfonilurea

El receptor de sulfonilurea (SUR) es la subunidad reguladora de los canales  $K_{ATP}$ , y es donde se une la glibenclamida. Existen dos isoformas, SUR1 y SUR2, siendo este último mayormente expresado en tejido cardíaco mientras que SUR1 se expresa abundantemente en páncreas y cerebro, así como en las neuronas y glía (37). SUR1 presenta mayor afinidad por la glibenclamida que SUR2. Los receptores SUR juegan un papel en la prevención de convulsiones, sensores de glucosa y en el preacondicionamiento de la isquemia cerebral (38).

Se ha demostrado que al haber un daño cerebral como en las contusiones o isquemia, existe una sobreexpresión del RNA mensajero de SUR1, tanto en NDM como en células de la glía (39). Simard y cols., reportaron el efecto positivo de la glibenclamida en un modelo de hemorragia subaracnoidea al disminuir la permeabilidad de la BHE, inhibición de la caspasa 3 activada y la gliosis. Esto lo demostraron por medio de la disminución en la expresión de GFAP y de  $TNF\alpha$  (40). El efecto de la glibenclamida a nivel de SNC ha sido ampliamente estudiada en modelos de isquemia y hemorragia cerebral, donde se ha visto que reduce el edema, el tamaño del infarto cerebral y mejora la función neurológica. Inclusive reportan que en pacientes diabéticos en tratamiento con glibenclamida tienen mejor pronóstico al sufrir un infarto cerebral que los pacientes que no están bajo este tratamiento (41).

Actualmente se encuentra un estudio en humanos en fase 2 el cual reporta un aumento en la supervivencia en el grupo con tratamiento posterior a una isquemia cerebral, en comparación con el grupo placebo (42). Además, se ha reportado una mejoría en la coordinación motora evaluada por pruebas conductuales en un modelo murino con 6-OHDA tratado con 1 y 5 mg/kg de glibenclamida (43).

## **2.7 Modelos murinos de EP**

Los modelos experimentales de EP se dividen en dos grupos: los genéticos y los generados por neurotóxicos. Los modelos genéticos se basan en los mecanismos potenciales ya identificados en la enfermedad. Sin embargo, estos no presentan una neurodegeneración o fenotipo característico. Esto se puede complementar con los modelos generados por neurotóxicos. En estos modelos, se utilizan moléculas que dañan la vía nigroestriatal, provocando la muerte de las NDM (44). Es importante tener en cuenta que a pesar de que ninguno de los modelos cumple con todos los requisitos de la enfermedad, estos han contribuido ampliamente al entendimiento de los procesos moleculares y las posibles terapias.

El uso de modelos inducidos por toxinas ha jugado un papel muy importante en la fisiopatología de la enfermedad. Las moléculas utilizadas en estos modelos son: 6-Hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), Paraquat (PQ), rotenona (45) y lipopolisacárido (LPS) (46). Cada uno presenta sus fortalezas y limitaciones, y dependiendo de lo que se busca, se elige el modelo apropiado.

### **2.7.1 Lipopolisacárido**

El LPS es una endotoxina la cual proviene de bacterias Gram negativas. El LPS es un potente activador de la microglía ya que se une a receptores CD14/TLR4/MD2 de células de la respuesta inmune (47). Esto promueve la liberación de citocinas proinflamatorias, óxido nítrico (NO) y superóxido. Estos efectos permiten el uso de la toxina como modelo de neuroinflamación en EP. Se ha descrito que este modelo genera una marcada gliosis reactiva en la sustancia nigra con una disminución de marcadores dopaminérgicos. Se ha observado que esta toxina no tiene un efecto directo sobre las neuronas dopaminérgicas y que la acción perjudicial hacia estas células es por su acción en la glía (48).

La inyección directa en la sustancia nigra (intraestriatal) produce una activación de la microglía en las primeras 24 horas y pérdida de DA en el cuerpo estriado a los 4 días, acompañada por pérdida de NDM para los 21 días (49) . La administración de LPS provoca cambios morfológicos en la microglía, a un estado activado o fagocítico. Sin embargo, este cambio de morfología revierte a los 30 días por lo que el efecto de la toxina no es prolongado y tampoco genera una activación progresiva (50). Otra característica similar a la EP y a otros modelos de EP, es el aumento de la permeabilidad de la BHE (51) y la pérdida de positividad de TH en las neuronas (52).

### **2.7.2 6-hidroxidopamina**

Es un análogo hidroxilado de la DA, con similitudes estructurales con la norepinefrina. La 6-OHDA es captada por el transportador de dopamina (DAT), lo que le brinda la especificidad hacia las NDM (53). La degeneración neuronal involucra la producción de peróxido de hidrógeno, la generación de radical superóxido y la autooxidación de la DA, que genera DA-quinona que oxida a las proteínas en los residuos de cisteínas altamente reactivos.

Se han propuesto tres mecanismos para explicar su citotoxicidad: 1) Auto-oxidación intracelular o extracelular de la molécula lo que genera la producción de peróxido de hidrógeno y radicales de superóxido e hidroxilo, 2) Formación de peróxido de hidrógeno por la MAO y 3) Inhibición directa del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (54).

La 6-OHDA no atraviesa la BHE, por lo que es necesario administrarla por inyección estereotáctica intracerebral en la sustancia nigra o el cuerpo estriado para dañar la vía dopaminérgica nigroestriatal. Al inyectarse de manera bilateral, los animales presentan afagia, adipsia y convulsiones, por lo que es más común su inyección unilateral. El modelo de lesión intraestriatal genera una muerte progresiva de las NDM en la SNpc, y reproduce algunos de las características más importantes de la EP como son la pérdida de las NDM, activación de la microglía en SNpc (55), aumento en la permeabilidad de la BHE (56). Otra de las ventajas que presenta este modelo es la sobreexpresión de SUR1 (57) en cerebro, lo que permite que la glibenclamida pueda ejercer un efecto.

### **3. Justificación**

La enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes en la actualidad. Sin embargo, los tratamientos actuales solo se basan en los síntomas motores mas no detienen o disminuyen la progresión de la neurodegeneración. Una de las características de la EP, es la neuroinflamación localizada en el mesencéfalo que lleva a la muerte de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas localizadas en la sustancia nigra pars compacta, un núcleo cerebral dopaminérgico con alta susceptibilidad al estrés celular y que se ve afectado durante la evolución de la EP.

Para el estudio de los eventos moleculares involucrados en la patogénesis de la EP, se han desarrollado diferentes modelos animales experimentales, entre los que se encuentran los generados por toxinas administradas de forma localizada al mesencéfalo, como el modelo con lipopolisacárido (LPS) y el modelo con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Las características más importantes de estos modelos son la activación de la glía; la inducción de neuroinflamación, y la muerte neuronal. Debido a esto logran proporcionar valiosa información de esta patología ya que emulan el deterioro motor parkinsoniano y son un modelo experimental ideal para el estudio de la neuroinflamación en la EP.

Recientemente se ha reportado que la glibenclamida; una sulfonilurea utilizada en el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2, ejerce un efecto neuroprotector en diversos modelos de daño cerebral, disminuyendo la neuroinflamación. En el presente trabajo se propone determinar si este efecto protector de la glibenclamida disminuye la neuroinflamación y la muerte neuronal inducida por las toxinas LPS y 6-OHDA.

#### **4. Hipótesis**

El tratamiento con glibenclamida disminuye la neuroinflamación y la muerte neuronal inducida por la lesión con LPS y 6-OHDA.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1 General**

Analizar el efecto neuroprotector de la glibenclamida en la lesión inducida por LPS y 6-OHDA.

##### **5.2 Específicos**

1. Evaluar el efecto protector de la glibenclamida sobre la coordinación motora en la lesión inducida por LPS y 6-OHDA.
2. Analizar el efecto protector de la glibenclamida sobre distintos tipos celulares del mesencéfalo en la lesión inducida por LPS y 6-OHDA.

## **6. Métodos**

### **6.1 Clasificación del estudio**

El presente trabajo es un estudio experimental, comparativo y considerado un estudio piloto.

### **6.2 Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar macho en un rango de peso de 247-284 g. Para el presente trabajo se utilizó una *n* de 34 animales.

### **6.3 Condiciones de alojamiento de los animales de experimentación**

Los animales de experimentación fueron colocados en cajas de acrílico transparente (33 x 44 x 20 cm) con pisos y paredes continuas sólidas y con tapa removible de reja, en una cama de 5 cm de aserrín para la suficiente absorción de desechos biológicos, se mantendrán en condiciones estándar, con agua y comida *ad libitum*, y períodos de luz/oscuridad de 12 horas. Cada individuo fue identificado con una línea en la cola, que se realizó con tinta de plumón no tóxica permanente y cada caja fue identificada con una tarjeta con sus respectivos datos. Todos los procedimientos descritos aquí se realizaron de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, y la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para el manejo de residuos biológicos infecciosos.

Los sujetos experimentales fueron adquiridos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma de Metropolitana que emite certificados de salud e inocuidad. Diariamente los individuos fueron pesados e inspeccionados para signos de malestar como piloerección, diarrea, pelaje amarillento, afectación respiratoria y cardíaca evidente, baja talla respecto a su peso, enrojecimiento atípico de mucosas, alteraciones motoras (incoordinación, inclinación anormal de la cabeza), alteraciones en tonicidad y distribución de vibrisas nasales; sospecha de abscesos o edemas; hipoactividad o hiperactividad superior al promedio de los animales control. Esto con el fin de asegurar su bienestar.

## 6.4 Criterios

### 6.4.1 Criterios de inclusión

Ratas Wistar machos en perfectas condiciones de salud

Peso en un rango de 247 a 284 gramos

### 6.4.2 Criterios de exclusión

Ratas de otra cepa diferente a la Wistar

No se encuentren en el rango de peso establecido

Edad mayor a 6 mese

### 6.4.3 Criterios de eliminación

Muerte durante el procedimiento

Desarrollo de enfermedades infecciosas

Signos de dolor posquirúrgicos que no puedan ser aliviados

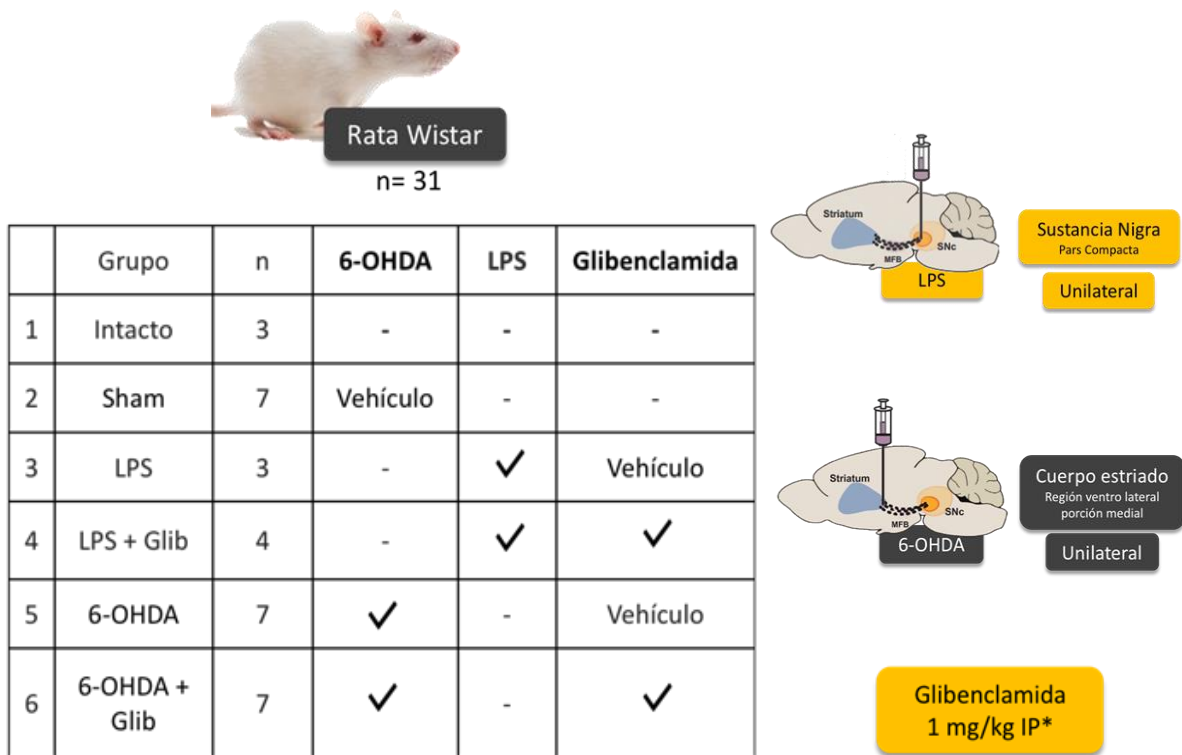
## 6.5 Grupos experimentales

Los grupos experimentales fueron distribuidos de la siguiente manera:

- 1) **Grupo intacto** (n=3): pruebas conductuales en los mismos tiempos que el resto de los grupos, sin tratamiento ni cirugía estereotáxica.
- 2) **Grupo sham** (n=7) cirugía estereotáxica con inyección unilateral en el cuerpo estriado de la solución vehículo de la 6-OHDA (PBS 0.1M conteniendo 0.2% de ácido ascórbico).
- 3) **Grupo LPS sin tratamiento** (n=3): cirugía estereotáxica con inyección unilateral en la Sustancia nigra de 5 µg de LPS (en 2µL de PBS 0.1M) e inyección intraperitoneal de la solución vehículo de la glibenclamida (500 µl de DMSO/PBS 0.1M (1:3)) cada 24 horas.



- 4) **Grupo LPS/Glibenclamida** (n=4): cirugía estereotáxica con inyección unilateral en la Sustancia nigra de 5 µg de LPS, e inyección intraperitoneal de 1 mg/Kg de glibenclamida (en 500µL de DMSO/PBS 0.1M (1:3)) cada 24 horas.
- 5) **Grupo 6-OHDA sin tratamiento** (n=7): cirugía estereotáxica con inyección unilateral en el cuerpo estriado de 20 µg de 6-OHDA (en 3 µL de PBS 0.1M conteniendo 0.2% de ácido ascórbico) e inyección intraperitoneal de la solución vehículo de la glibenclamida (500 µl de DMSO/PBS 0.1M (1:3)) cada 24 horas.
- 6) **Grupo 6-OHDA/Glibenclamida** (n=7): cirugía estereotáxica con inyección unilateral en el cuerpo estriado de 20 µg de 6-OHDA (en 3 µL de PBS 0.1M conteniendo 0.2% de ácido ascórbico) e inyección intraperitoneal de 1 mg/Kg de glibenclamida (en 500µL de DMSO/PBS 0.1M (1:3)) cada 24 horas.



**Figura 2. Esquema de los grupos experimentales.** Los animales de experimentación fueron divididos en 6 grupos. **n** número de ratas por grupo; **Glib** glibenclamida; **LPS** Lipopolisacárido; **6-OHDA** 6-hidroxidopamina; **Sham** grupo control negativo para tratamientos.

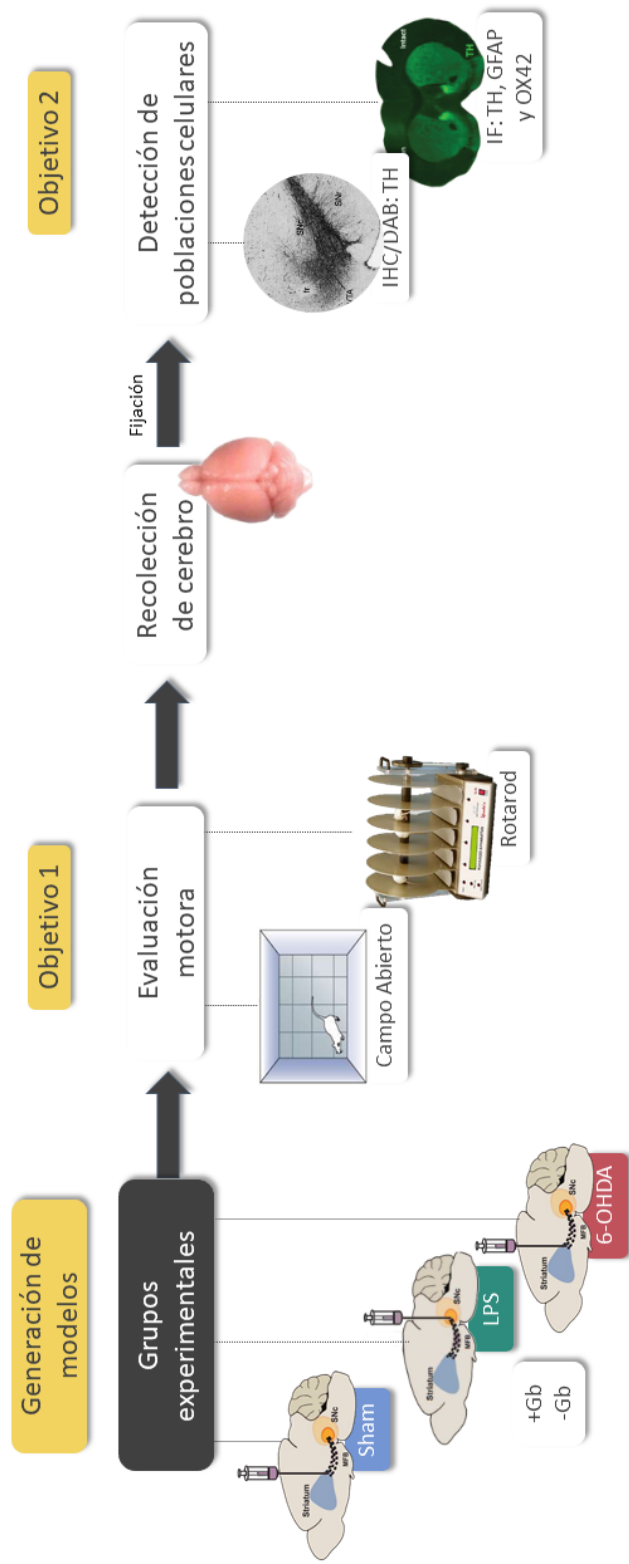
Notas:

- \* El período de análisis para los grupos tratados con LPS fue de 72 h.
- \* El período de análisis para los grupos tratados con 6-OHDA fue de 120 h.
- \* La inyección intracraneal de las toxinas por cirugía estereotáxica se realizó en el hemisferio izquierdo en todos los animales de experimentación.

Se procedió con este número de animales ya que se intentó utilizar el menor número de animales que siguieran dando resultados significativos, siguiendo las guías éticas de las 3R en particular la de reducción de animales. Se utilizaron dos modelos experimentales. En el modelo de LPS está demostrado que esta toxina causa activación de la glía y neuroinflamación. En el modelo de 6-OHDA se usaron mayor número de individuos ya que es de gran interés para nuestro grupo de trabajo por ser específico para causar degeneración de las NDM de la sustancia nigra. Estos dos modelos nos permitieron analizar la degeneración de las neuronas y la neuroinflamación. Se usaron 3 animales adicionales que recibieron LPS como control positivo en las determinaciones séricas.

- \* Total de animales= 34

6.6 Estrategia experimental



**Figura 3.** Estrategia experimental. Para la generación de los modelos experimentales se utilizaron ratas Wistar machos con un peso entre 247-284 gr. Se les administraron, mediante cirugía estereotáxica, las toxinas LPS en la sustancia nigra y 6-OHDA en el cuerpo estriado. A los grupos con tratamiento se les administró por vía intraperitoneal, 1 mg/Kg de glibenclamida cada 24 h, iniciando 48 h antes de la cirugía estereotáxica y hasta el término del experimento (120 h post cirugía para los grupos de 6-OHDA y 72 h post cirugía para los grupos de LPS). Los animales de experimentación fueron sometidos a la prueba de campo abierto y prueba de rotarod, para evaluar la actividad locomotriz espontánea y la coordinación motriz, respectivamente. Estas pruebas se realizaron 24 h antes de la cirugía estereotáxica y posteriormente a las 24 y 120 h para los grupos de 6-OHDA y 24 y 72 h para los grupos de LPS. Para la evaluación morfológica, se realizaron cortes en criostato de la región del mesencéfalo en orientación coronal y con un grosor de 35  $\mu$ m. Los cortes fueron preparados para realizar una inmunohistoquímica para detectar TH y una inmunofluorescencia para detectar TH, SUR1, GFAP y CD11b (OX-42).

## 6.7 Cirugía estereotáxica

Previo a la aplicación de anestesia se tomó la temperatura cefálica con un termómetro infrarrojo (modelo TS7). Posteriormente, se administró por vía intraperitoneal una dosis de 1.1 µl/g de Ketamina/Xilacina preparada a partir 70% de Ketamina (1000 mg/10 ml) y 30% Xilacina (20mg/ml). Una vez anestesiado el individuo, se verificó que no presentara reflejos en cola y almohadillas plantares, así como que tuviera respiración, ritmo cardiaco normal, y lubricación ocular apropiada.

El sujeto se colocó en el marco del aparato estereotáxico, fijando primeramente los conductos auditivos externos mediante lápices de acero inoxidable con bordes redondeados 18° (Stoelting) para evitar daño interno. Enseguida se fijaron los dientes frontales a la barra de incisivos a -6 mm, con esta maniobra se asegura al sujeto experimental. Se realizó asepsia con peróxido de hidrógeno al 10% y iodopovidona (10g/100ml) previo al corte con bisturí no. 3 de la piel y músculo que recubre al cráneo. Durante la intervención quirúrgica se verificó que los globos oculares, las mucosas y las capacidades de respiración sean normales. Los globos oculares fueron hidratados continuamente durante la cirugía con PBS 0.1 M pH 7.4 (8,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 138 mM de NaCl y 2,7 mM de KCl).

La inyección de LPS (5µg/2µl) se realizó en la región de la SNpc tomando como referencia las siguientes coordenadas: antero-posterior (A-P) +2.4 mm, medio-lateral (M-L) +1.8 mm y dorso-ventral (D-V) -6.9 mm. Para el grupo experimental con 6-OHDA (20µg/3µL) se realizó la inyección en la región ventrolateral del cuerpo estriado medial de la rata. Se tomaron como referencia las coordenadas: A-P +6.9 mm, M-L +4 mm y D-V -5.5 mm tomando como referencia la línea interaural. Se realizó un trépano con un microtaladro en el hemisferio izquierdo, y se administró una única inyección de LPS, 6-OHDA o vehículo con agujas dentales estériles (30 G, 0.30 x 25 mm) acopladas a un microinyector con un flujo de 0.05 µL/min.

Una vez inyectada la toxina o el vehículo, se dejaron transcurrir 5 minutos para permitir su completa difusión. Después se retiró la aguja lentamente y se limpió la zona cuidadosamente. Se aplicó cera de hueso (Atran), se procedió a suturar la herida con hilo #3.0 (seda) y se limpió la zona con PBS 0.1M. Se colocó una capa delgada de antibiótico terramicina en crema

(Oxitetraciclina/Polimixina B en ungüento 0.005 g/ 10 000 mg U) en el área de la herida. Finalmente, se les administró una dosis de 1 mL/Kg de antibiótico monohidrato de cefalexina (Rilexine 150; 150 mg c.b.p 1 ml, Virbac) y se colocaron en camilla (caja independiente) con temperatura controlada (26-30°C) hasta su completa recuperación.

Como parte del procedimiento posquirúrgico, se observó la respiración y su evolución posterior a la cirugía, verificando que los ojos y la nariz tengan coloración adecuada, al igual que se alimentaran y bebieran agua el mismo día de la cirugía. En el día posterior a la cirugía, se agruparon de nuevo para evitar el aislamiento social y se verificó que la sutura siguiera intacta y que no existieran datos de infección. Se monitoreó el peso diario hasta el día de término del experimento.

## 6.8 Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales realizadas en este estudio fueron la prueba de campo abierto y la prueba para evaluar la coordinación motora. Ambas pruebas se realizaron en los días -1, +1, +3 y +5, (siendo el día 0 el día de la cirugía). En la prueba de campo abierto se evalúa la actividad locomotriz espontánea. Esta prueba tuvo una duración de 5 minutos en donde se tomaron en cuenta distintas variables: el número de **cuadros cruzados**, tomando en cuenta que la rata cruzara por lo menos tres cuartas partes de la longitud de su cuerpo. Con esta variable se evalúa la actividad motora de la rata (hipoactiva o hiperactiva). La segunda variable fue la duración de los períodos de **conducta vertical**, cuando la rata se mantiene en una postura vertical, pasando los 90° apoyándose con sus extremidades posteriores. Esta variable evalúa la coordinación motora. La tercera variable fue el **acicalamiento**, períodos en el que la rata realiza movimientos estereotipados circulares y cortos con sus patas delanteras desde la región cefálica hasta el resto del cuerpo. Con esta variable se evalúa la coordinación motora ya que el cuerpo estriado es el encargado de coordinar estos movimientos (58).

Se colocó a la rata en una caja de acrílico o vidrio con las paredes opacas con una dimensión aproximada de 44 x 33 x 20 cm que en la base cuenta con una cuadrícula de 12 cuadros de 11 x 11 cm. Esta prueba fue videograbada para la realización de su registro por medio del Software Sdlcox de 32 bits (Tipo MS-2).

La prueba para evaluar la coordinación motora se realiza con la ayuda de un equipo llamado rotarod que consiste en una barra que gira a distintas velocidades (59). La barra mide 3 cm de diámetro, y está dividida en cuatro compartimentos de 7.5 cm de ancho, delimitados por discos de 25 cm de diámetro. Esta barra es colocada a una altura de 17 cm. Los animales de experimentación son colocados en cada compartimento. Para esta prueba se les realizó un acondicionamiento previo en el rotarod durante 3 días consecutivos (previos a la cirugía) de 5 min respectivamente a una velocidad de 5 rpm. A las ratas que se les dificultó el período de entrenamiento, fueron retiradas del experimento. El día de la evaluación, las ratas fueron colocadas sobre el rodillo y se midió el tiempo mientras caminaban sobre el rodillo hasta su caída (latencia a la caída). Al caer se accionó una lámina que detuvo el conteo. Se realizaron estas pruebas a distintas velocidades: 5, 10, 15 y 20 rpm por 2 minutos cada velocidad, con un período de reposo de 2 minutos entre cada velocidad. El tiempo fue registrado y se analizaron los datos en el sistema GraphPad Prism.

## **6.9 Determinaciones bioquímicas**

### **6.9.1 Glucemia**

La medición de glucosa en sangre se realizó con un glucómetro en tres momentos: previo al inicio del tratamiento con glibenclamida (48 horas previas a la cirugía); 2 horas previas a la cirugía estereotáxica (día 0); y 2 horas previas a la eutanasia de cada grupo. Para la toma de sangre, se realizó asepsia de la zona distal de la cola de la rata; con una lanceta se expuso una gota de sangre, para ser incluida en una tira reactiva. Se eliminó de la zona de muestreo todo rastro de sangre.

## **6.10 Obtención de las muestras**

Al finalizar los procedimientos experimentales, los animales recibieron sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (120 mg/kg). Una vez que la rata llegó a un plano quirúrgico de anestesia se realizó una incisión en la pared abdominal por debajo de la caja torácica. Se procedió a cortar la caja torácica por ambos lados con tijeras curvas, romas y se expuso la cavidad pleural elevando el esternón con una pinza hemostática. Se colectaron 2 mL de sangre de la arteria cardiaca con una jeringa de 3 mL (21G x 25mm). Posterior a la extracción de sangre, se pinzó la aorta descendente y se procedió a perfundir por punción cardiaca con 100 mL de PBS 0.1M seguida de 50 mL de paraformaldehído al 4% (PFA 4%) preparado en PBS 0.1M a pH 7.4. El

cerebro se extrajo de forma manual y se almacenó en PFA 4% por 48 horas. Transcurrido ese tiempo el fijador se reemplazó por una solución de sacarosa al 30% en PBS 0.1M pH 7.4.

## **6.11 Determinaciones séricas**

### **6.11.1 Perfil de funcionamiento hepático**

La sangre colectada se dejó reposar en tubos sin anticoagulante durante 10 minutos, posteriormente se centrifugaron por 10 minutos a 13,000 rpm a temperatura ambiente (T°amb). Se colectó el suero en tubos de 2 ml y se tomaron entre tres muestras de cada grupo las cuales fueron enviadas al Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para el análisis de las pruebas de funcionamiento hepático analizando las variables: creatinina, fosfatasa alcalina, GLDH, bilirrubina conjugada y total, AST, ALT, albúmina y proteínas totales. El resto de la muestra fue almacenado a -20°C para su posterior procesamiento. Como control positivo de las pruebas de funcionamiento hepático, se incluyeron 3 individuos que recibieron LPS (300 µg/Kg) por vía intraperitoneal, para posteriormente ser sacrificados a las 2 horas posteriores a la administración de la toxina.

## **6.12 Preparación de tejido para inmunotinciones**

Los cerebros colectados fueron cortados en criostato con orientación coronal, con un grosor de 35 µm iniciando desde la coordenada interaural 6.08 mm hasta la coordenada interaural 2.16 mm (60). Se colectaron 60 cortes coronales de la región mesencefálica distribuidos en 6 pozos. El tejido fue almacenado en una solución de sacarosa al 30% en PBS 0.1M pH 7.4 a -20°C hasta su utilización.

## **6.13 Inmunofluorescencia indirecta para TH, SUR1, GFAP y CD11b/c**

Cada lote de tejido fue lavado 3 veces con 300 µL de PBS 0.1M para eliminar la sacarosa 30%. Posterior al lavado, los cortes fueron permeabilizados con PBS-Tritón 0.1% 3 veces por 5 minutos cada uno. Se sometieron a recuperación de antígeno con SDS 0.5% durante 5 minutos. Los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con 10% de suero de caballo en PBS-Tritón 0.05% durante 1 hora en agitación a T°amb. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS

0.1 M durante 5 minutos cada uno. El tejido fue incubado toda la noche combinando los anticuerpos descritos en la tabla 1.

**Tabla 1.** Anticuerpos primarios y secundarios.

<b>Anticuerpos Primarios</b>	<b>Anticuerpos Secundarios</b>
Anti-TH producido en: ratón      dilución: 1:1000 marca: Sigma-Aldrich      cat: T1299	Anti-IgG conjugado con Alexa Fluor 488 reacciona contra: ratón dilución: 1:1000 marca: Abcam cat: ab150105
Anti-TH producido en: conejo      dilución: 1:250 marca: Abcam      cat: ab6211	Anti-IgG conjugado con biotina reacciona contra: ratón dilución: 1:200 marca: Vector Labs cat: BA-2000
Anti- CD11b/c (OX42) producido en: ratón      dilución: 1:1000 marca: Abcam      cat: ab1211	
Anti-SUR1 producido en: ratón      dilución: 1:500 marca: Abcam      cat: ab32844	Anti-IgG conjugado con Texas Red reacciona contra: conejo dilución: 1:1000 marca: Abcam cat: ab150077
Anti-GFAP producido en: conejo      dilución: 1:300 marca: Abcam      cat: ab68428	

Los anticuerpos se prepararon en PBS-Tritón 0.05% con 1.5% de suero de caballo, en un volumen final de 300  $\mu$ L. Después de la incubación con los anticuerpos correspondientes, los cortes fueron lavados 2 veces con PBS-Tritón 0.05%. Se incubaron con 1  $\mu$ M de Hoechst por 5 minutos a T°amb. Después de 3 lavados con PBS 0.1M, el tejido se colocó en portaobjetos, se dejaron secar y se les aplicó el medio de montaje para fluorescencia, Vectashield® (Vector Laboratories, EU). Cada laminilla fue protegida con cubreobjetos y se selló con esmalte. Las preparaciones fueron analizadas con un microscopio LEICA DM1000 acoplado a la cámara DCF450.



#### **6.14 Inmunohistoquímica con diaminobencidina (DAB)**

Para la visualización de las neuronas TH positivas se realizó inmunohistoquímica con DAB. Se les realizaron 3 lavados con PBS 0.1M para eliminar la solución de sacarosa 30%. Posteriormente se inactivó la peroxidasa endógena con metanol absoluto frío 10%/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en PBS 0.1M. Se lavaron los tejidos con PBS 0.1M y se incubaron con solución de bloqueo (suero de caballo 10% en PBS-Tritón 0.05%). Posterior a lavados se incubó con Anti-TH monoclonal (Tabla 1) por 24 horas a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tritón 0.05% por 5 minutos y se incubó con el anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón hecho en caballo (1:200, Vector Laboratories, EU) durante 2 h a T°amb. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tritón 0.05% previo a la incubación con el Kit ABC® (Vector Laboratories, EU) por 2 h a T°amb. La solución de ABC® contenía una gota de reactivo A y una gota de reactivo B en 5 mL de PBS-Tritón 0.05%.

Se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS 0.1M. Posteriormente los tejidos se incubaron con el Kit de DAB (Vector Laboratories, EU) a T°amb el tiempo necesario para el cambio de color deseado. La solución de DAB se preparó con dos gotas de buffer, cuatro gotas de DAB y dos gotas de níquel, en agua bidestilada. Para detener la reacción del cromógeno, el tejido fue sumergido en agua bidestilada y posteriormente, se lavó con PBS 0.1M. Cada corte fue colocado en portaobjetos, permitiendo el secado durante 24 horas. Finalmente, el tejido fue cubierto con el medio de montaje Entellan® seguido de cubreobjetos. La observación de las preparaciones histológicas se realizó en un microscopio LEICA DM1000 acoplado a la cámara DCF450.

#### **6.15 Análisis densitométrico**

Se seleccionó la SNpc (Fig. 3), de la cual se identificaron las regiones lateral, medial e interior. Se adquirieron micrografías de cada una de las regiones (n=3) y se determinó el número de Unidades Relativas (UR) de la expresión del marcador de interés (TH, Cd11b/c, GFAP) empleando el software ImageJ®. Previo a la medición de los valores de UR, todas las micrografías fueron normalizadas con balance de brillo y contraste homogéneo a partir de Photoshop V6.0.

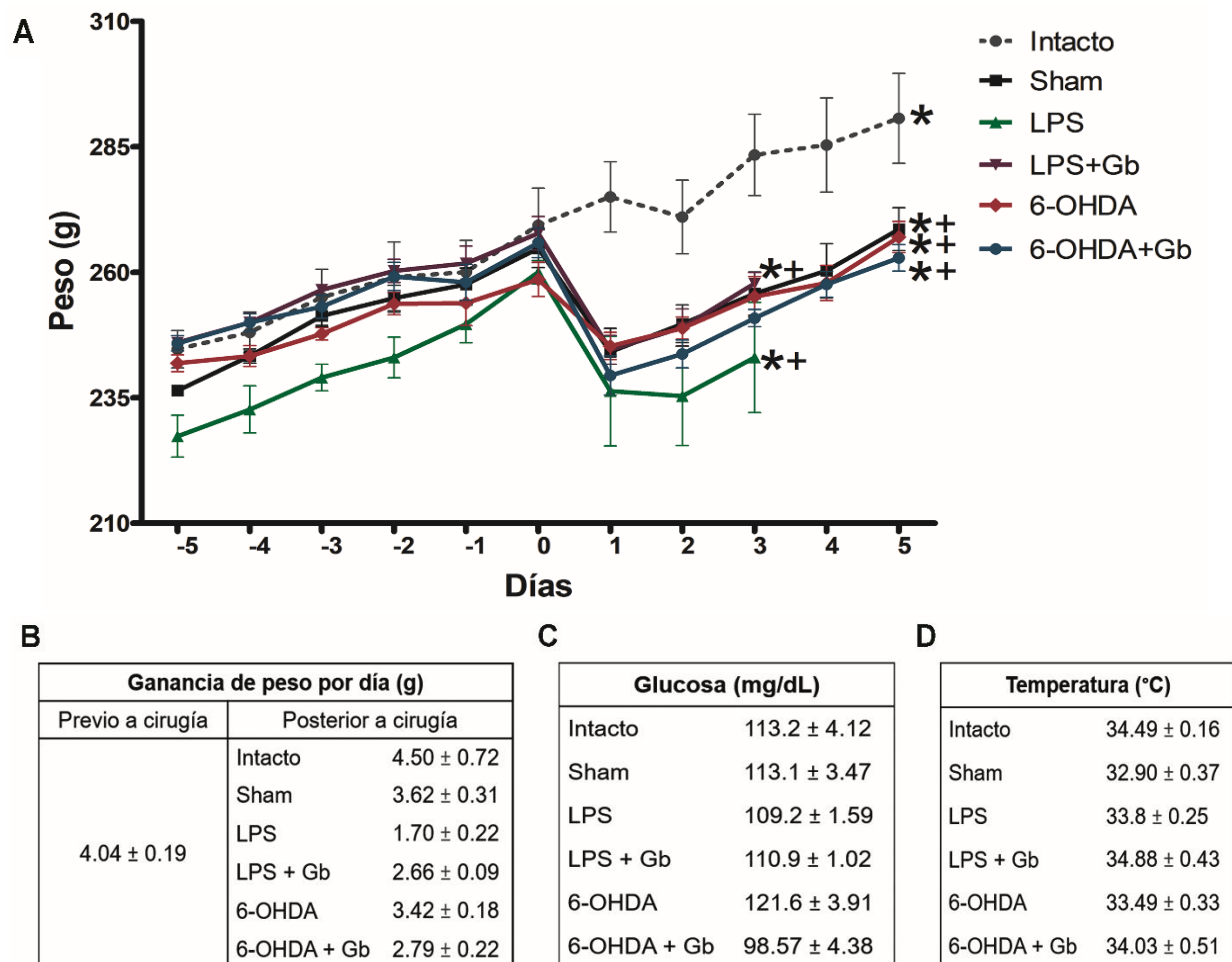
### **6.16 Análisis estadístico**

Para distinguir diferencias entre los grupos a nivel conductual, variación de peso, pruebas de funcionamiento hepático y valores de densidad óptica se empleó ANDEVA unifactorial seguida de prueba *post hoc* Newman Keuls ( $p < 0.05$ ).

## 7. Resultados

### 7.1 Determinación de peso, glucemia y temperatura

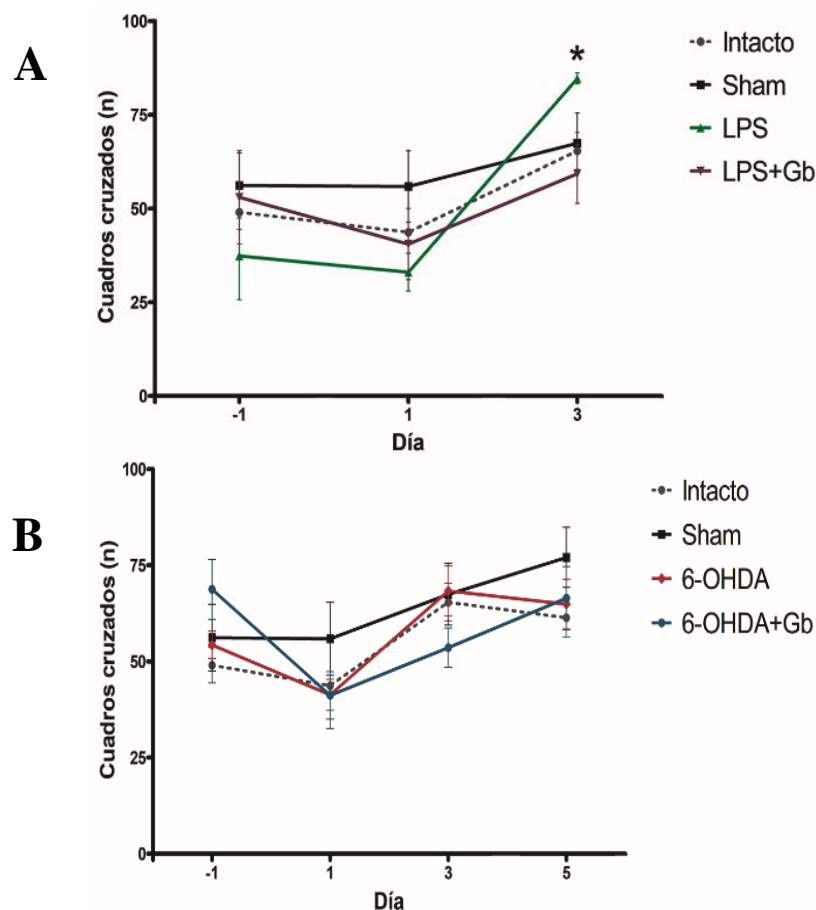
Para asegurar el bienestar de las ratas, se registró el peso previo a la cirugía. Documentamos que el peso se incrementó  $4.04 \pm 0.19$  g. por día (Fig. 4A, día -5 a 0 y B). Los grupos intervenidos quirúrgicamente, presentaron una disminución de peso transitoria con una recuperación progresiva (Fig. 4A, día 0 a 5). Debido a que la glibenclamida es un hipoglucemiante, se registró el nivel de glucosa de cada rata para descartar un efecto adverso. En la fig. 4C se observa que la administración de glibenclamida no induce disminución de glucosa en sangre. Además, se cuantificó la temperatura previa a la inyección del anestésico y los resultados no reflejaron variaciones significativas entre grupos (Fig. 4D). Se determinó que la sobrevida fue del 96.87%.



**Figura 4. Registro de peso, nivel de glucosa y temperatura corporal.** A) Curva de variación de peso corporal. B) Ganancia de peso pre y post cirugía. C) Glucosa. D) Temperatura. \* $p < 0.05$  vs Peso inicial; +  $p < 0.05$  vs Intacto. ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Student-Newman-Keuls. g, gramos; mg/dL, miligramos por decilitro; °C, grados centígrados.

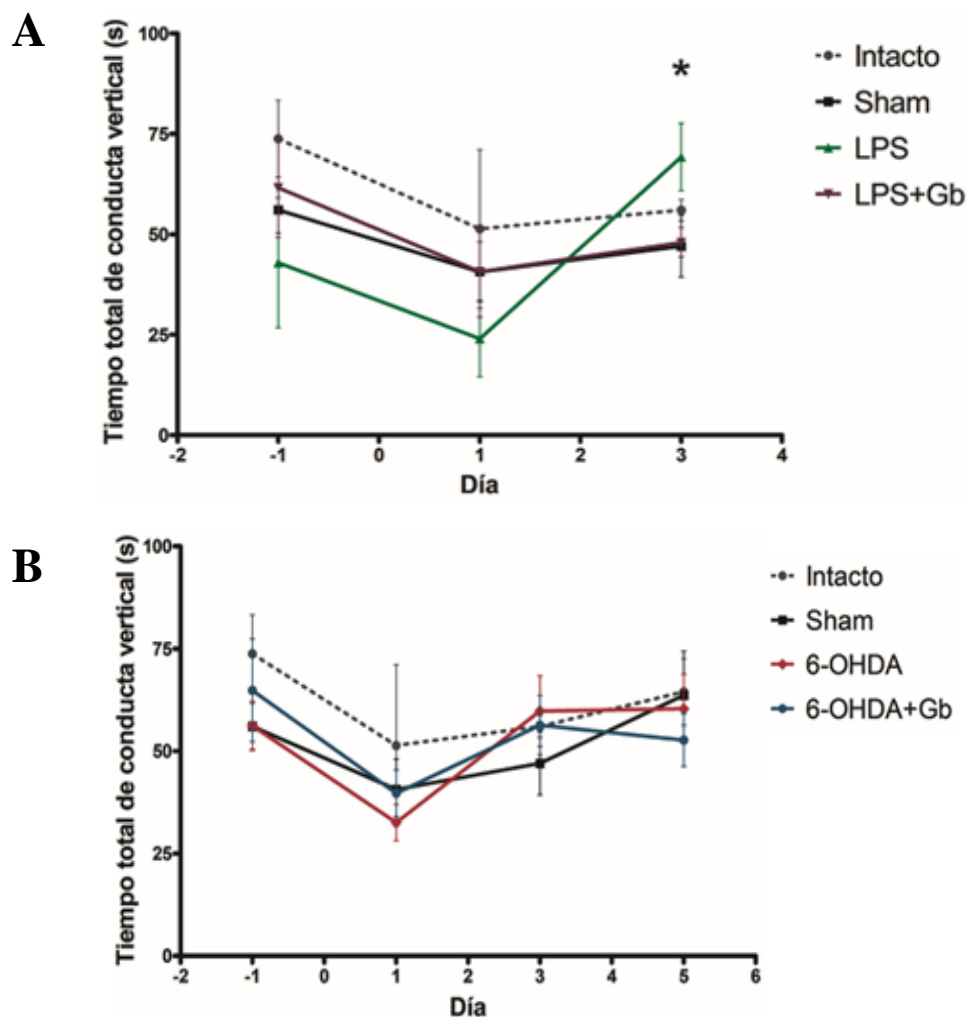
## 7.2 Pruebas conductuales

Para evaluar la actividad locomotriz espontánea se realizó la prueba de campo abierto. En esta prueba se analizan las variables de cuadros cruzados, conducta vertical y acicalamiento. En la variable de cuadros cruzados se analiza la actividad motora de la rata (hipo o hiperactividad). En los resultados podemos observar que el grupo sham presenta un patrón similar al grupo intacto. En los grupos que recibieron inyección de LPS se observa una hiperactividad al día 3 post cirugía con respecto a su día 1 post cirugía y se observa que, con el tratamiento de glibenclamida, esta hiperactividad se restablece. Sin embargo, no se presenta una diferencia significativa (Fig. 5A). El grupo lesionado con 6-OHDA presenta una tendencia a disminuir el número de cuadros cruzados comparándolo con el grupo sham, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa. Mientras que el grupo que recibió el tratamiento con glibenclamida no presenta un efecto significativo en la actividad evaluada por el número de cuadros cruzados al día del corte (Fig. 5B).



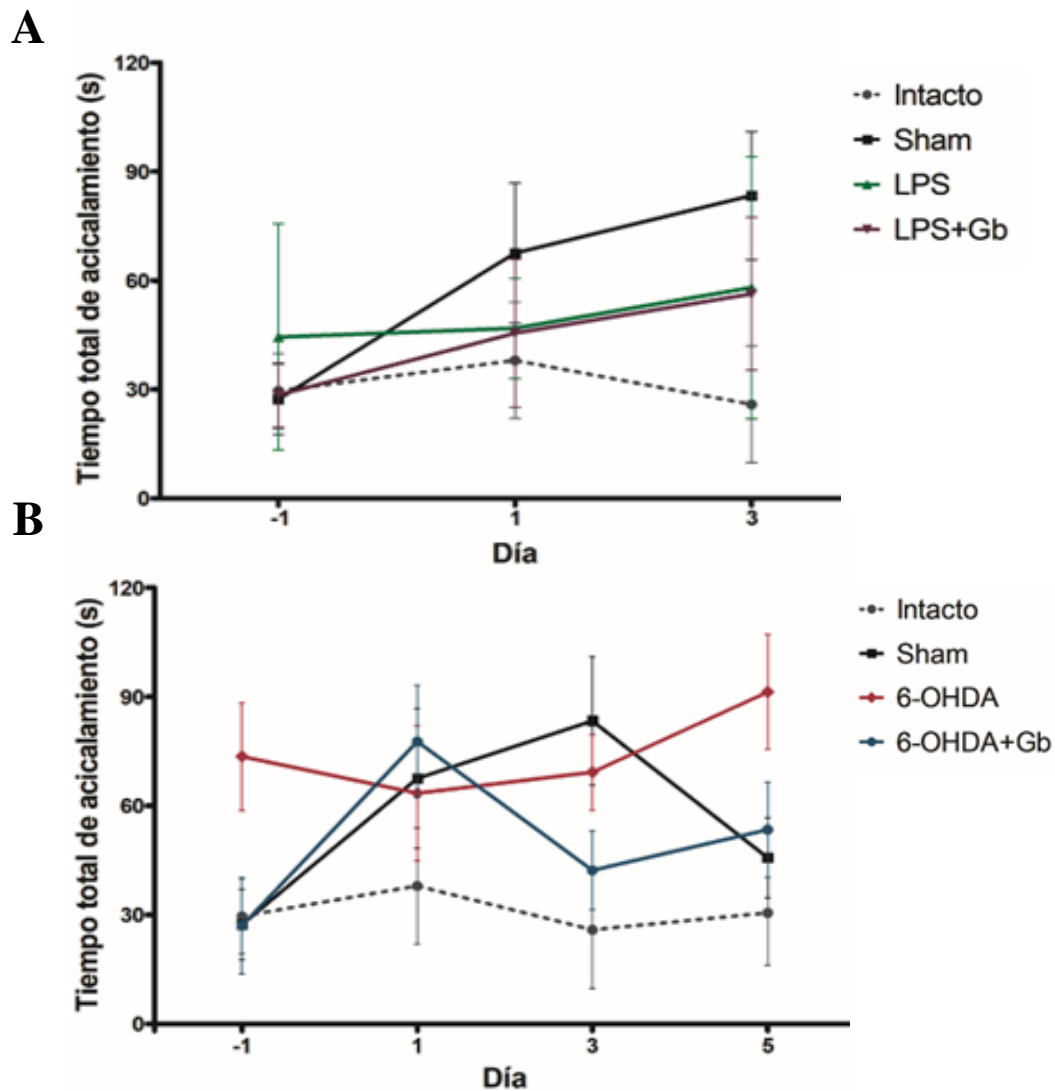
**Figura 5. Prueba de campo abierto (Variable: Cuadros cruzados).** A) Grupos lesionados con LPS B) Grupos lesionados con 6-OHDA \* $p < 0.05$  vs Día +1. ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Student-Newman-Keuls. **n**, número de cuadros cruzados.

La variable de conducta vertical consiste en medir el tiempo que la rata se mantiene erguida con respecto al piso apoyada en sus extremidades posteriores. Esta variable evalúa la coordinación motora y podría emular la inestabilidad postural. En esta prueba se observó que el tiempo total que las ratas se mantienen en posición vertical es similar en los grupos sham e intacto. En el grupo lesionado con LPS, se observa un aumento significativo en la conducta vertical al día 3 post cirugía. Sin embargo, este comportamiento se restaura con el tratamiento con glibenclamida (Fig. 6A). El grupo lesionado con 6-OHDA no presenta cambios significativos con respecto al grupo sham. En el grupo que recibió tratamiento con glibenclamida, se observa un tiempo de posición vertical similar a los controles (Fig. 6B).



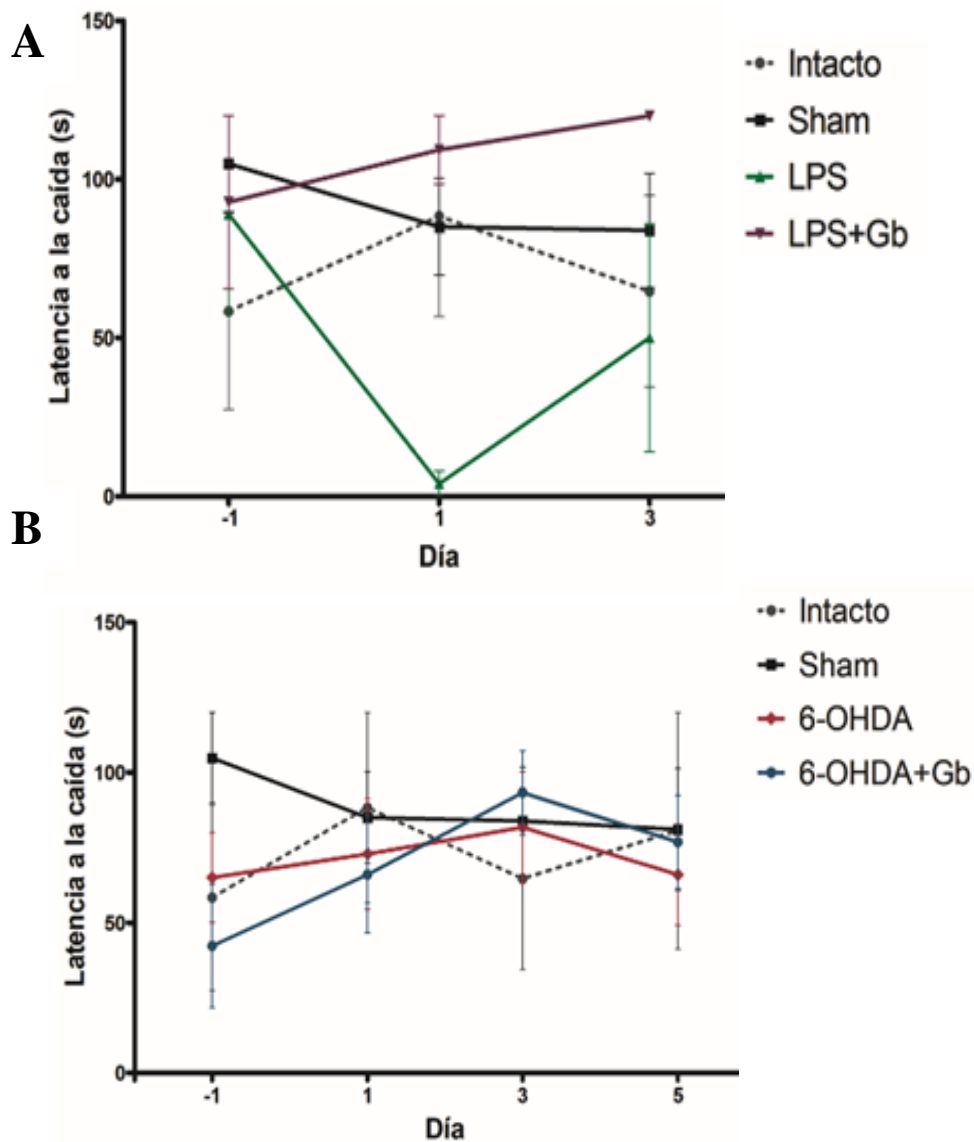
**Figura 6. Prueba de campo abierto (Variable: conducta vertical). A) Grupos lesionados con LPS. B) Grupos lesionados con 6-OHDA. \* $p > 0.05$ . n, número de cuadros cruzados.**

En la variable de acicalamiento se cuantifica el tiempo que el animal se mantiene realizando movimientos estereotipados cortos circulares con sus extremidades anteriores en dirección cefálico-caudal. Esta variable fue analizada debido a que la región dorsolateral del cuerpo estriado coordina estos movimientos. El grupo sham presenta un aumento no significativo en el tiempo con respecto al grupo intacto. El grupo lesionado con LPS no presenta un aumento en el tiempo de acicalamiento significativo con respecto al grupo sham y el tratamiento con glibenclamida no modifica este tiempo (Fig. 7A). El grupo lesionado con 6-OHDA, muestra una tendencia al aumento en el tiempo de acicalamiento, y con el tratamiento se restablece a niveles similares del grupo intacto, sin embargo, no resulta significativo (Fig. 7B).



**Figura 7. Prueba de campo abierto (Variable: Tiempo total de acicalamiento).** A) Grupos lesionados con LPS. B) Grupos lesionados con 6-OHDA.  $p > 0.05$ . s, segundos.

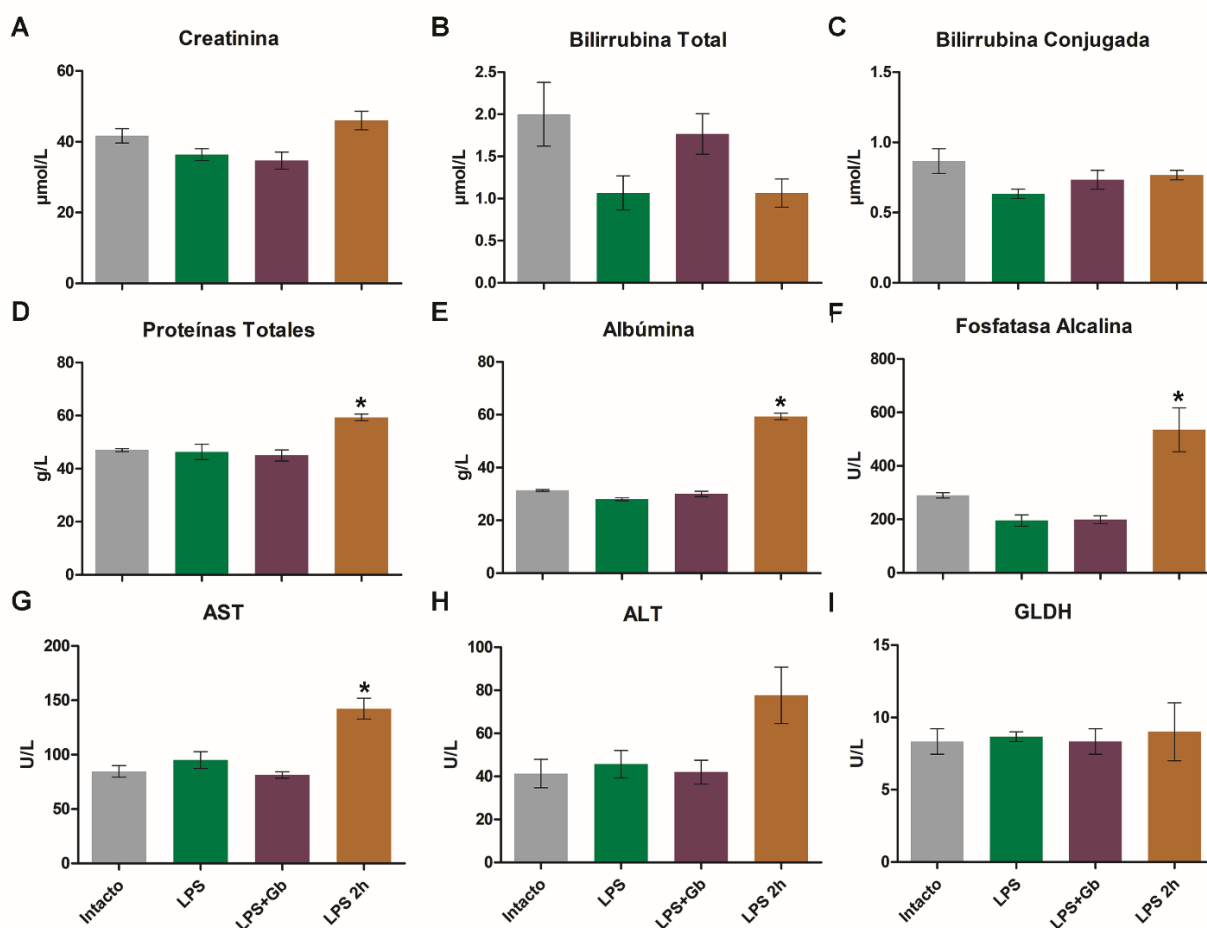
La coordinación motora fue evaluada con el parámetro de latencia a la caída por medio del equipo rotarod. En la figura 8 se observa que el grupo sham no presenta cambio en la latencia a la caída con respecto al grupo intacto. Las ratas del grupo lesionado con LPS tuvieron problemas para caminar sobre el rodillo al día 1 post cirugía, pero al día 3 post cirugía presentan una latencia a la caída similar a la del grupo intacto. LPS con tratamiento presenta una tendencia al aumento de la latencia, aunque esta no es significativa (Fig. 8A). El grupo lesionado con 6-OHDA sin tratamiento mantiene la misma latencia a la caída que el grupo sham, al igual que el grupo tratado con glibenclamida (Fig. 8B).



**Figura 8. Prueba de coordinación motora. A)** Grupos lesionados con LPS. **B)** Grupos lesionados con 6-OHDA.  $p > 0.05$ . s, segundos.

### 7.3 Pruebas de función hepática

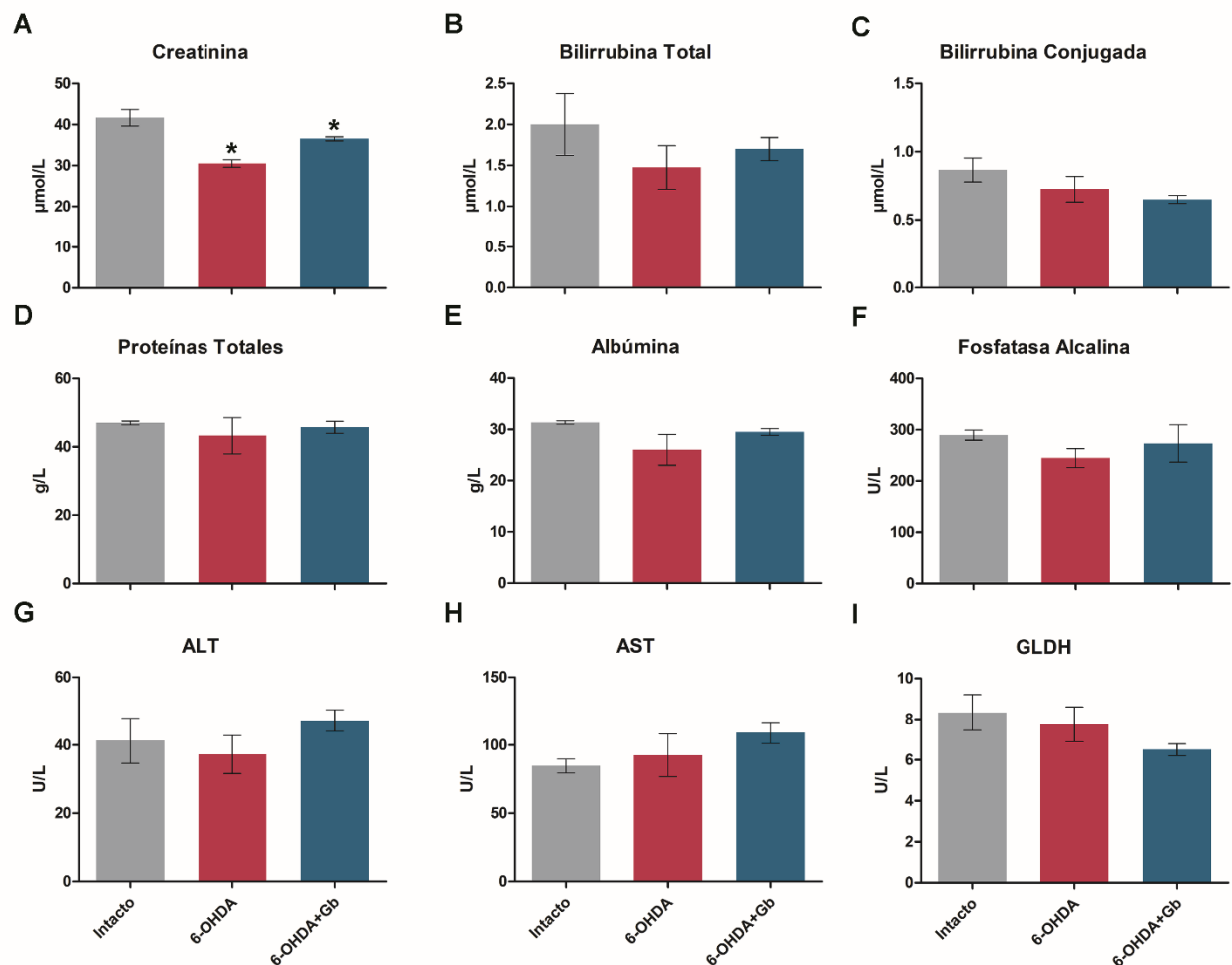
Para evaluar el estado metabólico y el efecto de las toxinas en los animales de experimentación, se realizaron pruebas de función hepática. Se determinaron los niveles de proteínas totales, creatinina, bilirrubina total y conjugada, albumina, fosfatasa alcalina, ALT, AST y GLDH. Ninguno de estos parámetros muestra cambios significativos en los grupos lesionados con LPS, con y sin tratamiento con glibenclamida. Sin embargo, se puede observar un aumento significativo en proteínas totales, albúmina, fosfatasa alcalina y AST del grupo al que se le administró LPS por 2 horas, considerado como control positivo ya que se sabe que la administración de LPS induce aumento de enzimas como la fosfatasa alcalina (Fig. 9D-H).



**Figura 9. Determinaciones séricas del grupo lesionado con LPS.** \* $p < 0.05$  vs intacto. ALT, alanina aminotransferasa; AST, Aspartato aminotransferasa; GLDH, glutamato deshidrogenasa;  $\mu\text{mol/L}$ , micromol/litro; g/L, gramo/litro; U/L, unidades internacionales/litro; Gb, glibenclamida.



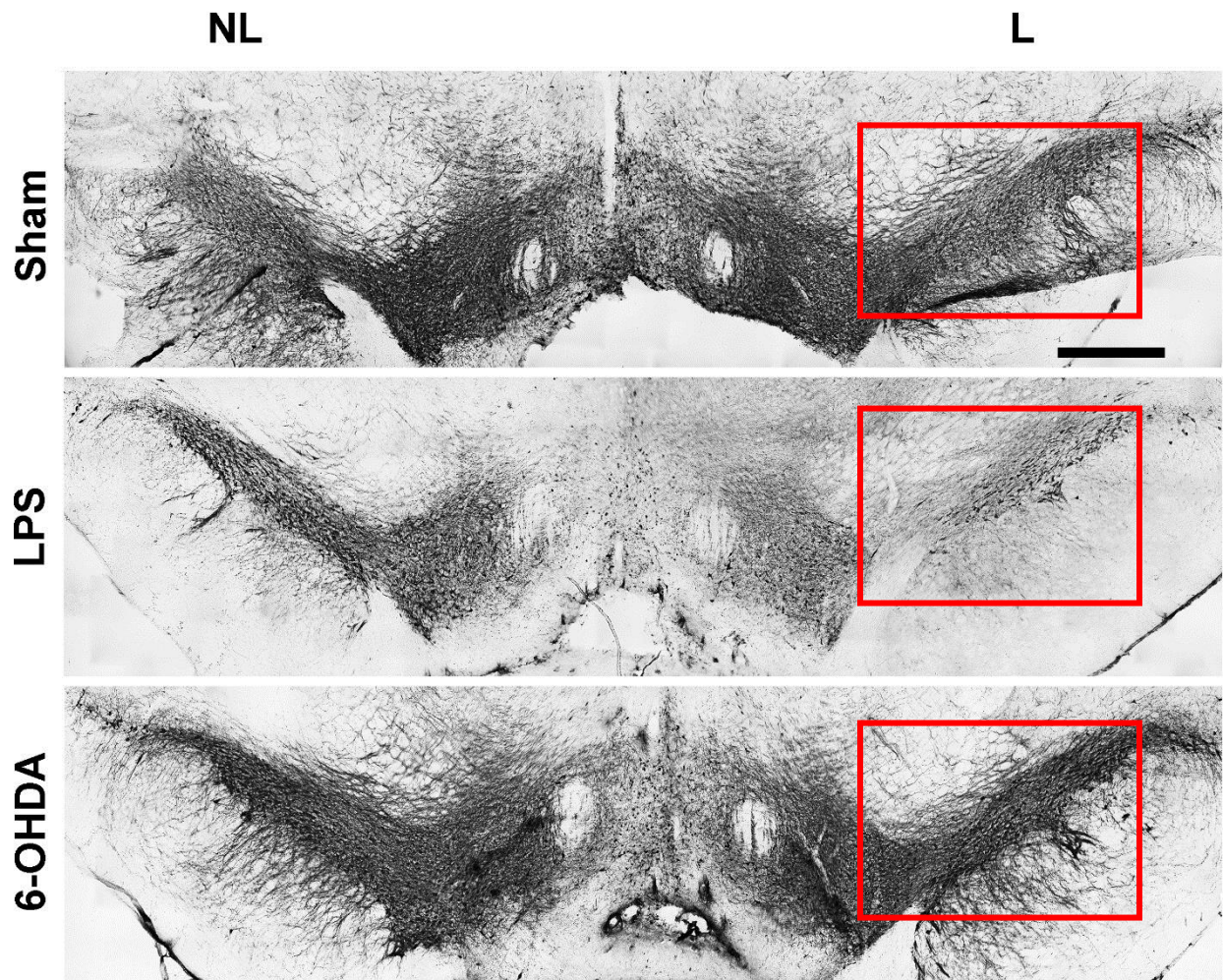
En los grupos lesionados con 6-OHDA, se observó que la concentración de creatinina disminuyó significativamente de 41.67  $\mu\text{mol/L}$  en el grupo intacto a 30.5  $\mu\text{mol/L}$  en el grupo lesionado con 6-OHDA, y a 36.5  $\mu\text{mol/L}$  en el grupo lesionado con 6-OHDA y tratado con glibenclamida. Esto representa una disminución del 12.4% del grupo lesionado con 6-OHDA y del 26.8% en el grupo lesionado con 6-OHDA y tratado con glibenclamida en comparación con el grupo control, (Fig. 10A). En el resto de los parámetros no se observaron cambios significativos (Fig. 10B-I).



**Figura 10. Determinaciones séricas del grupo lesionado con 6-OHDA.** \* $p < 0.05$  vs grupo intacto. **ALT**, alanina aminotransferasa; **AST**, Aspartato aminotransferasa; **GLDH**, glutamato deshidrogenasa;  $\mu\text{mol/L}$ , micromol/litro; **g/L**, gramo/litro; **U/L**, unidades internacionales/litro; **Gb**, glibenclamida.

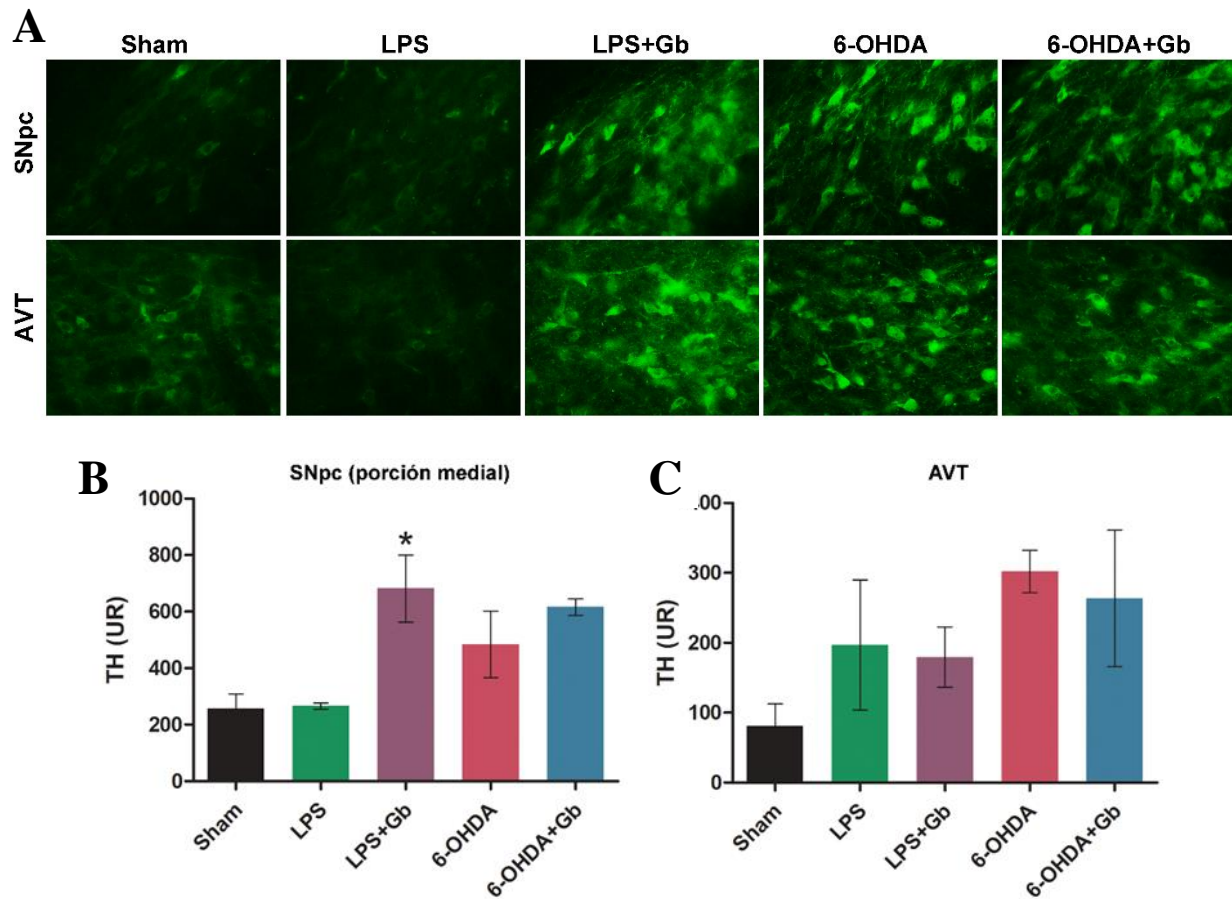
#### 7.4 Análisis morfológico

Para determinar la lesión inducida por LPS y 6-OHDA, se realizó un inmunomarcaje para detectar el marcador dopaminérgico, TH en las NDM. En el grupo lesionado con LPS se observó una disminución considerable en la inmunorreactividad para TH en el lado lesionado de la SNpc con respecto al sham y al lado no lesionado (Fig. 11). Esto sugiere un daño en la población de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas o un cambio de fenotipo. En el grupo lesionado con 6-OHDA se observa una ligera disminución en la inmunorreactividad para TH en la SNpc con respecto a su lado no lesionado. En el grupo sham no se observan cambios en la inmunorreactividad para TH en ninguno de los lados.



**Figura 11. Lesión inducida por LPS y 6-OHDA en el mesencéfalo de rata.** Micrografía representativa de corte coronal donde se muestra la inmunorreactividad a TH en la sustancia nigra y el AVT de los grupos sham, LPS y 6-OHDA. NL, lado no lesionado; L, lado lesionado.

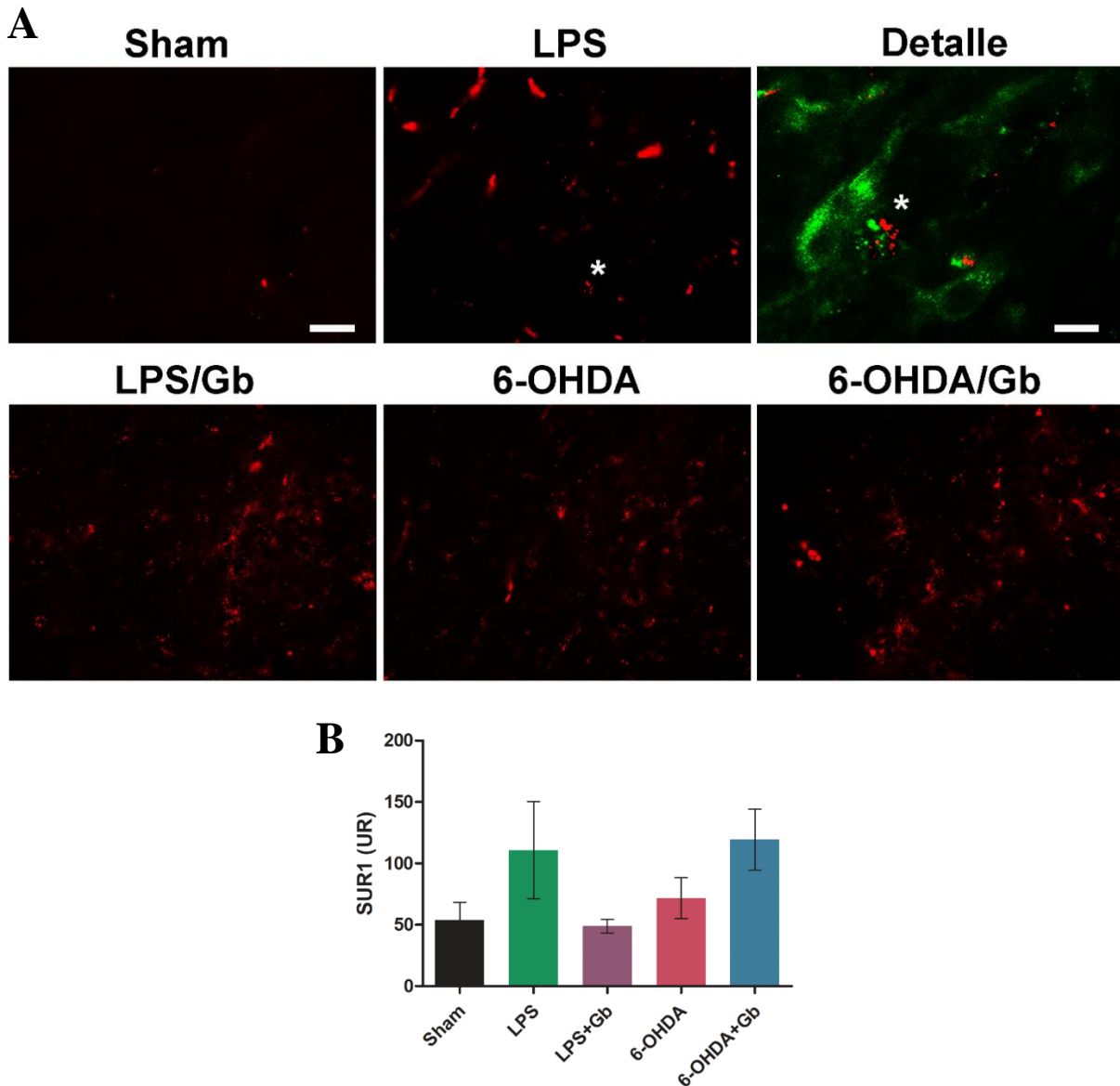
Para determinar el efecto de la glibenclamida en la lesión inducida por LPS y 6-OHDA, se realizó el inmunomarcaje para detectar TH en las NDM (Fig. 12). En el grupo lesionado con LPS se observa el daño causado por la toxina a las NDM en la región de la SNpc y el área ventral tegmental (AVT), ya que disminuye la inmunorreactividad para TH con respecto al grupo sham y al control. Sin embargo, el grupo que recibió el tratamiento con glibenclamida presenta un aumento significativo de la inmunorreactividad para TH con respecto al grupo LPS (Fig. 12A y B). Mientras que se puede observar que la glibenclamida no tiene efecto sobre la lesión causada por 6-OHDA. En el AVT no se observan cambios entre los grupos, confirmado por análisis densitométricos (Fig. 12C).



**Figura 12. Efecto de la glibenclamida en la lesión inducida por LPS y 6-OHDA.** **A)** Micrografías representativas del inmunomarcaje para TH de los distintos grupos. Imágenes superiores tomadas de la porción medial de la SNpc. Imágenes inferiores tomadas del AVT. **B)** Análisis densitométrico de la inmunorreactividad para TH en la porción medial de la SNpc. **C)** Análisis densitométrico de la inmunorreactividad para TH en el AVT. \* $p < 0.05$  vs LPS. **Gb**, Glibenclamida; **SNpc**, sustancia nigra pars compacta; **AVT**, área ventral tegmental; **TH**, tirosina hidroxilasa; **UR**, unidades relativas.

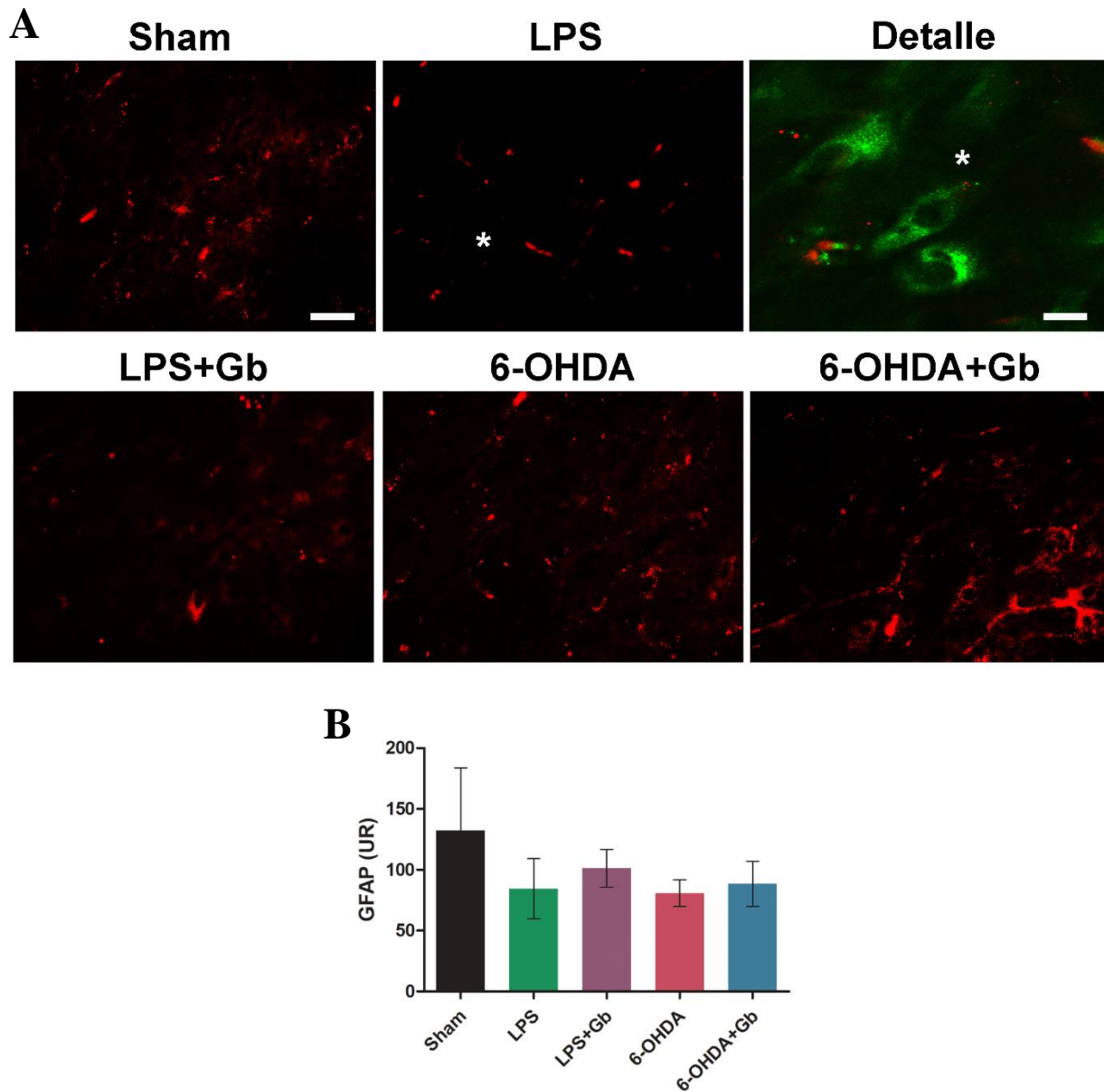


Para determinar si la expresión del receptor de la glibenclamida, SUR1, se modificaba por acción de las toxinas, se realizó un inmunomarcaje. En la figura 13, se observa que la expresión de SUR1 aumenta ligeramente después del tratamiento con glibenclamida (Fig. 13A). Para confirmar este aumento, se realizó el análisis densitométrico y se determinó que estas diferencias no son significativas (Fig. 13B).



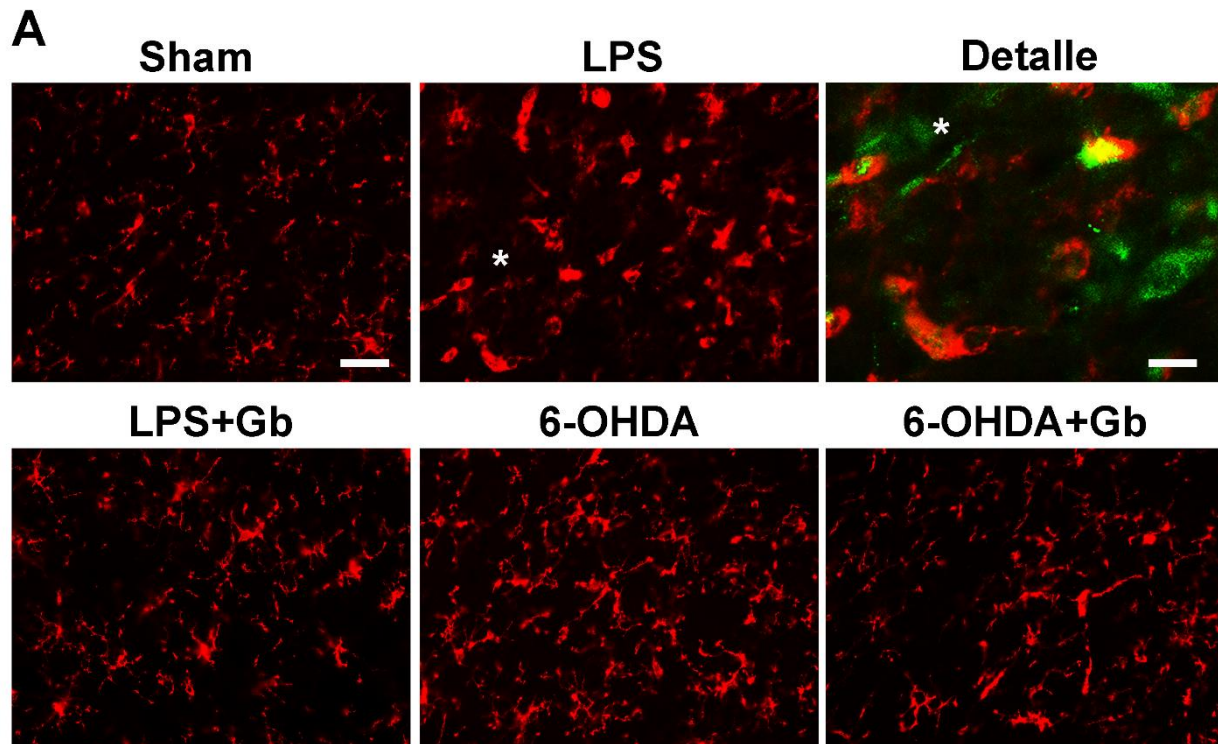
**Figura 13. Efecto de la glibenclamida en la expresión de SUR1.** **A)** Micrografías representativas del inmunomarcaje para SUR1 de los distintos grupos en la porción medial de la SNpc. El detalle muestra el traslape de la señal de SUR1 (en rojo) y TH (en verde). **B)** Análisis densitométrico de la inmunorreactividad para SUR1 de la porción medial de la SNpc. **Gb**, glibenclamida; **UR**, unidades relativas.

Para analizar el efecto de la glibenclamida en la población de astrocitos, se detectó el marcador GFAP. En la figura 14A se puede observar que la expresión de GFAP disminuye con respecto al grupo sham y que con el tratamiento con glibenclamida, se restablece; sin embargo, estos cambios en los niveles de expresión no fueron significativos, como lo demuestra el análisis densitométrico (Fig. 14B).

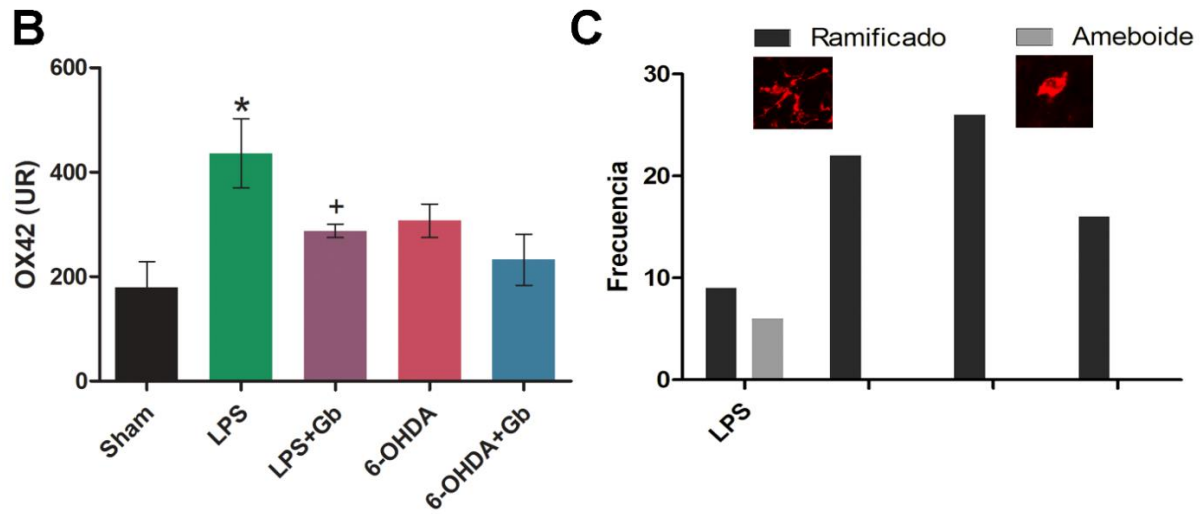


**Figura 14. Efecto de la glibenclamida en la expresión de GFAP.** **A)** Micrografías representativas del inmunomarcaje para GFAP de los distintos grupos en la porción medial de la SNpc. El detalle muestra el traslape de la señal de GFAP (en rojo) y TH (en verde). **B)** Análisis densitométrico de la inmunorreactividad para SUR1 de la porción medial de la SNpc. **Gb**, glibenclamida; **UR**, unidades relativas.

Para estudiar si la glibenclamida atenúa la respuesta inflamatoria en estos modelos, analizamos la expresión de CD11b (OX-42), un marcador para la activación de microglía durante la respuesta de neuroinflamación. En la figura 15A, se puede observar que en el grupo de sham está presente la microglía con una morfología ramificada y delgada, característica de la microglía en reposo. En el grupo lesionado con LPS se observó una marcada activación de la microglía con cambios morfológicos de una apariencia ramificada a una morfología ameboide y un aumento en la densitometría (Fig. 15B). Mientras que el tratamiento con glibenclamida cambió la morfología de la microglía y permanece en un estado ramificado, sin presencia de microglía ameboide y una disminución en la densidad de la inmunofluorescencia (Fig. 15B). En el grupo lesionado con 6-OHDA se observó una tendencia no significativa al aumento de CD11b (OX42) la cual disminuyó con el tratamiento (Fig. 15B).



**Figura 15. Efecto de la glibenclamida en la neuroinflamación.** A) Micrografías representativas del inmunomarcaje para CD11b (OX42) de los distintos grupos en la porción medial de la SNpc. El detalle muestra el traslape de la señal de CD11b (en rojo) y TH (en verde). \*zona ampliada en detalle.



**Figura 15. Efecto de la glibenclamida en la neuroinflamación.** Continuación. **B)** Densitometría para CD11b (OX42) de la porción medial de la SNpc. **C)** Frecuencia de la presencia de la morfología ramificada o ameboide. \* $p < 0.05$  vs Sham. + $p < 0.05$  vs LPS.

## 8. Discusión

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial. Se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas debido a la neuroinflamación persistente. La muerte de las NDM provoca una disminución en el contenido de la dopamina en el cuerpo estriado dando lugar a los síntomas motores característicos como temblor en reposo, bradicinesia, inestabilidad postural y rigidez.

Las EP es una enfermedad multifactorial en donde en el 90% de los casos se desconocen las causas que provocan este padecimiento. El 10% restante de los casos tienen un componente hereditario. El tratamiento actual se basa en controlar los síntomas motores utilizando fármacos como la levodopa. Sin embargo, pierde eficacia con el uso crónico. Uno de los medicamentos que se han estudiado para disminuir la neuroinflamación y que a mostrado un efecto protector en otras enfermedades que afectan el sistema nervioso central es la glibenclamida.

En este trabajo se quiso demostrar que la glibenclamida tiene un efecto protector contra la neuroinflamación inducida por las toxinas LPS y 6-OHDA en tiempos tempranos de 3 y 5 días respectivamente. Se evaluó mediante pruebas conductuales el estado físico de las ratas con la prueba de campo abierto, tomando en cuenta variables como cuadros cruzados, conducta vertical y acicalamiento. En nuestras condiciones se encontró que las ratas no no presentaban cambio significativo en la actividad locomotora analizada con la distancia recorrida en metros al igual que en la conducta vertical y el tiempo de acicalamiento en los días 1, 3 y 5 posterior a la cirugía, con respecto al grupo control. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Fornaguera y cols. (61), donde las ratas Wistar macho con un rango de peso de  $386.5 \pm 7.8$  g. recibieron dos inyecciones de 4  $\mu$ L de 6-OHDA en el cuerpo estriado.

Para evaluar el estado metabólico de las ratas lesionadas con LPS y 6-OHDA, se realizaron pruebas serológicas para determinar el perfil de función hepática. En nuestros resultados observamos una disminución significativa de la creatinina en el grupo lesionado con 6-OHDA. Esto puede deberse a la disminución del peso de las ratas después de la cirugía, ya que la creatinina es un producto de desecho que se genera a partir de la degradación de la creatina. Debido a que la



cantidad de creatina por unidad de masa muscular y su degradación es consistente, la concentración plasmática de creatinina refleja de manera directa el porcentaje de masa muscular (62, 63). Los resultados de los parámetros de fosfatasa alcalina, ALT y AST en el modelo de 6-OHDA concuerdan con lo publicado por Vairetti y cols. (64) en el cual no se encontraron cambios a las 24 horas, 4 semanas y a las 8 semanas posterior a la inyección con la toxina. Además, observamos en el modelo de LPS sistémico analizado 2 horas después de su administración, un aumento de la fosfatasa alcalina, que de acuerdo con Tuin y cols. (65), es debido a una respuesta fisiológica a la toxina, ya que se ha demostrado que la fosfatasa alcalina desfosforila a la molécula de LPS convirtiéndolo en una molécula no tóxica.

Para analizar la población de NDM se realizó la detección de la expresión del marcador dopaminérgico, TH. En los resultados se demostró que la inyección con el vehículo (grupo sham) no produjo alteraciones evidentes en la inmunorreactividad a TH, mientras que la inyección con LPS produjo una marcada disminución de esta inmunorreactividad, lo que puede deberse a la muerte neuronal o a la pérdida del fenotipo dopaminérgico. Estudios previos han demostrado la disminución de TH posterior a la inyección intranigral de LPS (48) debido a muerte neuronal y no solo a la disminución de la expresión de la enzima TH (66). En el grupo lesionado con 6-OHDA sólo se observó una ligera disminución de la expresión de TH en la SNpc en el día 5 posterior a la cirugía. Esto concuerda con el mecanismo de degeneración retrógrada de las neuronas dopaminérgicas (67) y que el efecto evidente de muerte neuronal se comienza a observar a partir del día 21 posterior a la cirugía (68).

En el modelo de LPS intracraneal se ha reportado que posterior a la inyección de la endotoxina hay una ausencia de astrocitos en el área que rodea al sitio de inyección con activación de astrocitos en la periferia (52, 69). En nuestros resultados se observó una tendencia a la disminución de la expresión de GFAP en las ratas lesionadas con LPS, que se recupera después del tratamiento con glibenclamida, aunque los análisis estadísticos no demostraron diferencias significativas. La ausencia de activación de astrocitos puede ser debido al corto período de exposición a la toxina LPS (de 3 días), ya que la activación de astrocitos aumenta gradualmente con el tiempo (70) y se observa a partir del día 9 hasta los 6 meses (47).

En el modelo de 6-OHDA también se observó una ausencia de cambios en la expresión de GFAP en ambos grupos (con y sin tratamiento con glibenclamida), esto anteriormente reportado por distintos autores (68). Sin embargo, se ha reportado aumento de la expresión de GFAP, 7 días posteriores a la inyección estriatal de 6-OHDA (67).

Para evaluar la neuroinflamación, se realizó la detección del marcador de microglía, CD11b (OX-42). Su expresión indica una activación de las células de la microglía. En el grupo lesionado con 6-OHDA se observa una tendencia al aumento de la expresión de CD11b con respecto al grupo sham y en el grupo con tratamiento con glibenclamida disminuye la expresión de CD11b, aunque, después del análisis estadístico no se encontró una diferencia significativa. La ausencia de la activación de la microglía puede deberse al corto tiempo del análisis (5 días) ya que ha sido demostrado la activación de la microglía a partir del día 10 post-lesión en este modelo (71). En el modelo de LPS se ha reportado el aumento de la expresión de CD11b (OX-42) alcanzando el máximo nivel de expresión a las 24 horas manteniendo hasta las 168 horas con un cambio de morfología ramificada a ameboide dependiente del tiempo (70, 72). En este trabajo observamos que el grupo con LPS, la microglía presentaba una morfología ameboide; la cual es un indicador de la activación de estas células a un estado fagocítico, a los tres días post-lesión, sin embargo, en el grupo con tratamiento con glibenclamida, la morfología se mantuvo ramificada. Esto puede ser debido a que la glibenclamida detuvo la activación de la microglía o revirtió este efecto de manera aguda. En este trabajo se observó que los modelos muestran el comportamiento observado en la literatura y que el tratamiento con glibenclamida tiene un efecto protector.

## **9. Conclusión**

- \* El LPS y la 6-OHDA en tiempos tempranos, día 3 y 5 respectivamente, no inducen alteraciones motoras en ratas Wistar.
- \* La glibenclamida previno la activación de la microglía a un estado fagocítico en el modelo de LPS.
- \* Las toxinas no tuvieron efecto sobre la función hepática, lo que nos indica la especificidad que tienen hacia las NDM.

## 10. Referencias

1. Cervantes-Arriaga A, Rodríguez-Violante M, López-Ruiz M, Estrada-Bellmann I, Zúñiga-Ramírez C, Otero-Cerdeira E, *et al.* Caracterización de la enfermedad de Parkinson en México: estudio ReMePARK. *Gaceta Médica de México* 2013; 149:497-501.
2. Secretaría de Salud Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención. 2010, 95.
3. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; 39:889-909.
4. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79:368-76.
5. Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonuccelli U, Damier P, *et al.* Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Mov Disord* 2004; 19:997-1005.
6. Shadrina MI, Slominsky PA, Limborska SA. Molecular Mechanisms of Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 2010; 281:229-66.
7. Mena MA, García de Yébenes J. Glial cells as players in parkinsonism: the "good", the "bad" and the "mysterious" glia. *Neuroscientist* 2008; 14:544-60.
8. Walsh S, Finn DP, Dowd E. Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience* 2011; 175:251-61.
9. Barres BA. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron* 2008; 60:430-40.
10. Pekny M, Pekna M. Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1862:483-91.
11. Barcia C. Glial-mediated inflammation underlying parkinsonism. *Scientifica* 2013; 2013:1-15.
12. Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, *et al.* In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2006; 21:404-12.
13. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis* 2010; 37:510-18.
14. Cabezas R, Avila FA, Torrente D, Santos El-Bachá R, Morales L, Gonzalez J, *et al.* Astrocytes role in Parkinson: A double-edged sword. in: *Neurodegenerative diseases* (U Kishore).

15. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 2009; 8:382-97.
16. O'Callaghan JP, Sriram K, Miller DB. Defining "neuroinflammation": Lessons from MPTP- and methamphetamine-induced neurotoxicity. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1139:318-30.
17. Gray MT, Woulfe JM. Striatal Blood–Brain Barrier Permeability in Parkinson's Disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35:747-50.
18. Reale M, Iarlori C, Thomas A, Gambi D, Perfetti B, Di Nicola M, *et al.* Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* 2009; 23:55-63.
19. Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 1994; 165:208-10.
20. Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, *et al.* Interleukin-1 Beta, Interleukin-6, Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor-Alpha Are Elevated in the Brain from Parkinsonian Patients. *Neurosci Lett* 1994; 180:147-50.
21. Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 2008; 167:90-95.
22. Sadek HL, Almohari SF, Renno WM. The Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *J Alzheimers Dis Parkinsonism* 2014; 4:148.
23. Chertoff M, Di Paolo N, Schoeneberg A, Depino A, Ferrari C, Wurst W, *et al.* Neuroprotective and neurodegenerative effects of the chronic expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice. *Exp Neurol* 2011; 227:237-51.
24. Trigo-Damas I, Blesa J, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat* 2015; 9:91.
25. Segura-Aguilar J, Paris I, Muñoz P, Ferrari E, Zecca L, Zucca FA. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem* 2014; 129:898-915.
26. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; 39:151-70.
27. Barcia C, Ros CM, Ros-Bernal F, Gómez A, Annese V, Carrillo-de Sauvage MA, *et al.* Persistent phagocytic characteristics of microglia in the substantia nigra of long-term parkinsonian macaques. *J Neuroimmunol* 2013; 261:60-66.

28. Zhang W, Phillips K, Wielgus AR, Liu J, Albertini A, Zucca FA, *et al.* Neuromelanin activates microglia and induces degeneration of dopaminergic neurons: Implications for progression of parkinson's disease. *Neurotox Res* 2011; 19:63-72.
29. Daneman R, Prat A. The Blood-Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7:a020412.
30. Korteckaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, Willemsen AT, *et al.* Blood-brain barrier dysfunction in Parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol* 2005; 57:176-79.
31. Burke MA, Mutharasan RK, Ardehali H. The Sulfonylurea Receptor, an Atypical ATP-Binding Cassette Protein, and Its Regulation of the KATP Channel. *Circ Res* 2008; 102:164-76.
32. Ortega FJ, Jolkkonen J, Mahy N, Rodríguez MJ. Glibenclamide Enhances Neurogenesis and Improves Long-Term Functional Recovery after Transient Focal Cerebral Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33:356-64.
33. Mehta RI, Tosun C, Ivanova S, Tsybalyuk N, Famakin BM, Kwon MS, *et al.* Sur1-Trpm4 Cation Channel Expression in Human Cerebral Infarcts. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015; 74:835-49.
34. Zhang G, Lin X, Zhang S, Xiu H, Pan C, Cui W. A Protective Role of Glibenclamide in Inflammation-Associated Injury. *Mediators Inflamm* 2017; 2017:1-11.
35. Gopalakrishnan M, Molinari EJ, Shieh CC, Monteggia LM, Roch JM, Whiteaker KL, *et al.* Pharmacology of human sulphonylurea receptor SUR1 and inward rectifier K(+) channel Kir6.2 combination expressed in HEK-293 cells. *Br J Pharmacol* 2000; 129:1323-32.
36. Karschin C, Ecker C, Ashcroft FM, Karschin A. Overlapping distribution of KATP channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in rodent brain. *FEBS Lett* 1997; 401:59-64.
37. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP 4th, Boyd AE 3rd, González G, *et al.* Cloning of the beta high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995; 268:423-26.
38. Martínez-Valverde T, Vidal-Jorge M, Martínez-Saez E, Castro L, Arikan F, Cordero E, *et al.* Sulfonylurea Receptor 1 in Humans with Post-Traumatic Brain Contusions. *Journal of Neurotrauma* 2015; 32:1478-87.

39. Schiemann J, Schlaudraff F, Klose V, Bingmer M, Seino S, Magill PJ, *et al.* K-ATP channels in dopamine substantia nigra neurons control bursting and novelty-induced exploration. *Nature Neuroscience* 2012; 15:1272-80.
40. Simard JM, Geng Z, Woo SK, Ivanova S, Tosun C, Melnichenko L, *et al.* Glibenclamide Reduces Inflammation, Vasogenic Edema, and Caspase-3 Activation after Subarachnoid Hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29:317-30.
41. Simard JM, Sheth KN, Kimberly WT, Stern BJ, del Zoppo GJ, Jacobson S, *et al.* Glibenclamide in cerebral ischemia and stroke. *Neurocrit Care* 2014; 20:319-33.
42. Sheth KN, Elm JJ, Molyneaux BJ, Hinson H, Beslow LA, Sze GK, *et al.* Safety and efficacy of intravenous glyburide on brain swelling after large hemispheric infarction (GAMES-RP): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Neurol* 2016; 15:1160-69.
43. Piri H, Haghdoust-Yazdi H, Fraidouni N, Dargahi T, Yaghoubidoust M, Azadmehr A. The anti-parkinsonism effects of KATP channel blockade in the 6-hydroxydopamine-induced animal model: The role of oxidative stress. *Basic Clin Neurosci* 2017; 8:183-92.
44. Tieu K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; 1:a009316.
45. Zhang K, Gao J, Zhang Z. Evaluation of Parkinson's disease in 3 rat models induced by three different unilateral injections of 6-hydroxydopamine. *J Pharm Biomed Sci* 2015; 5:842-47.
46. Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, *et al.* A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 2009; 137:47-59.
47. Herrera AJ, Castaño A, NVenero JL, Cano J, Machado A. The Single Intranigral Injection of LPS as a New Model for Studying the Selective Effects of Inflammatory Reactions on Dopaminergic System. *Neurobiol Dis* 2000; 7:429-47.
48. Iczkiewicz J, Rose S, Jenner P. Increased osteopontin expression following intranigral lipopolysaccharide injection in the rat. *Eur J Neurosci* 2005; 21:1911-20.
49. Meredith GE, Sonsalla PK, Chesselet MF. Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol* 2008; 115:385-98.
50. Iravani MM, Leung CC, Sadeghian M, Haddon CO, Rose S, Jenner P. The acute and the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction and glial cell activation. *Eur J Neurosci* 2005; 22:317-30.

51. Tomás-Camardiel M, Venero JL, de Pablos RM, Rite I, Machado A, Cano J. In vivo expression of aquaporin-4 by reactive microglia. *J Neurochem* 2004; 91:891-99.
52. Castaño A, Herrera AJ, Cano J, Machado A. Lipopolysaccharide Intraneural Injection Induces Inflammatory Reaction and Damage in Nigrostriatal Dopaminergic System. *J Neurochem* 1998; 70:1584-92.
53. Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2005; 2:484-94.
54. Hernández-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurología* 2017; 32:533-39.
55. Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Broom L, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2009; 110:966-75.
56. Carvey PM, Zhao CH, Hendey B, Lum H, Trachtenberg J, Desai BS, *et al.* 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability. *Eur J Neurosci* 2005; 22:1158-68.
57. Wang S, Hu LF, Yang Y, Ding JH, Hu G. Studies of ATP-sensitive potassium channels on 6-hydroxydopamine and haloperidol rat models of Parkinson's disease: implications for treating Parkinson's disease? *Neuropharmacology* 2005; 48:984-92.
58. Berridge KC. Substantia nigra 6-OHDA lesions mimic striatopallidal disruption of syntactic grooming chains : A neural systems analysis of sequence control. *Psychobiol* 1989; 17:377-85.
59. Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, Funayama M, Takamatsu Y, Ikeda K, *et al.* A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neurosci Methods* 2010; 189:180-85.
60. Paxinos G, Watson C *The Rat Brain in stereotaxic coordinates* Elsevier, London, 2007.
61. Fornaguera J, Schwarting RK. Time Course of Deficits in Open Field Behavior After Unilateral Neostriatal 6-hydroxydopamine Lesions. *Neurotox Res* 2002; 4:41-49.
62. Kamal A. Estimation of blood urea (BUN) and serum creatinine level in patients of renal disorders. *Indian J Fundam Appl Life Sci* 4:199-202.



63. Baxmann AC, Ahmed MS, Marques NC, Menon VB, Pereira AB, Kirsztajn GM, *et al.* Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary creatinine and serum cystatin. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3:348-54.
64. Vairetti M, Ferrigno A, Rizzo V, Ambrosi G, Bianchi A, Richelmi P, *et al.* Impaired hepatic function and central dopaminergic denervation in a rodent model of Parkinson's disease: A self-perpetuating crosstalk? *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822:176-84.
65. Tuin A, Huizinga-Van der Vlag A, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, Poelstra K. On the role and fate of LPS- dephosphorylating activity in the rat liver. *AM J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290:G377-85.
66. Iravani MM, Kashefi K, Mander P, Rose S, Jenner P. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience* 2002; 110:49-58.
67. Gomide VC, Silveira GA, Chadi G. Transient and widespread astroglial activation in the brain after a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. *Int J Neurosci* 2005; 115:99-117.
68. Batassini C, Broetto N, Tortorelli LS, Borsoi M, Zanotto C, Galland F, *et al.* Striatal injury with 6-OHDA transiently increases cerebrospinal GFAP and S100B. *Neural Plast* 2015; 2015:1-9.
69. Tomás-Camardiel M, Rite I, Herrera AJ, de Pablos RM, Cano J, Machado A, *et al.* Minocycline reduces the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction , peroxynitrite-mediated nitration of proteins , disruption of the blood – brain barrier , and damage in the nigral dopaminergic system. *Neurobiol Dis* 2004; 16:190-210.
70. Flores-Martínez YM, Fernandez-Parrilla MA, Ayala-Davila J, Reyes-Corona D, Blanco-Alvarez VM, Soto-Rojas LO, *et al.* Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide. *J Immunol Res* 2018; 2018:1-19.
71. Crotty S, Fitzgerald P, Tuohy E, Harris DM, Fisher A, Mandel A, *et al.* Neuroprotective effects of novel phosphatidylglycerol-based phospholipids in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2008; 27:294-300.

72. Zhu L, Xiang P, Guo K, Wang A, Lu J, Tay SS, *et al.* Microglia/monocytes with NG2 expression have no phagocytic function in the cortex after LPS focal injection into the rat brain. *Glia* 2012; 60:1417-26.